

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Localisation du transporteur ABCB5 et étude de son rôle comme suppresseur de tumeur impliqué dans le mélanome

Martinet, Caroline

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**LOCALISATION DU TRANSPORTEUR ABCB5 ET ETUDE DE SON ROLE DE
SUPPRESSEUR DE TUMEUR IMPLIQUÉ DANS LE MELANOME**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Caroline MARTINET

Janvier 2015

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Localisation du transporteur ABCB5 et étude de son rôle comme suppresseur de tumeur impliqué dans le mélanome

MARTINET Caroline

Résumé

L'incidence du mélanome cutané n'a cessé d'augmenter lors de ces trente dernières années. Lorsqu'il est métastasé, ce cancer est résistant aux traitements conventionnels tels que la chimiothérapie. Des études ont montré qu'ABCB5, un transporteur ABC est impliqué dans ce mécanisme de résistance. Ce transporteur est principalement exprimé dans les cellules pigmentées incluant les mélanocytes. En outre, il serait un marqueur des cellules souches cancéreuses. Malgré ces données, ce transporteur est très peu caractérisé. Ce mémoire s'articule autour de trois axes. Une étude récente menée par notre laboratoire a montré qu'*ABCB5* pourrait être un gène suppresseur de tumeur. Il est muté dans 14% des mélanomes analysés. De plus cette étude a montré que des mutations dans le gène suppresseur de tumeur *CDKN2A* et le proto-oncogène *NRAS*, étaient présentes dans 62.5% et 75%, respectivement, des échantillons mutés pour *ABCB5*. Notre premier objectif a consisté à développer trois souches murines *knock-out* pour le gène *Abcb5*, couplée à une activation d'un proto-oncogène (*NRas* ou *HRas*) ou à la délétion d'un gène suppresseur de tumeur (*Cdkn2a*). Ces souris nous permettront d'étudier, *in vivo*, le caractère suppresseur de tumeur d'*Abcb5*. À ce stade précoce, nous n'avons pu observer de tumeurs. En parallèle, nous avons étudié la localisation intracellulaire d'ABCB5 grâce à un fractionnement par centrifugation différentielle. Nos données préliminaires indiquent que ce transporteur est localisé dans les fractions N (nucléaire) et P (microsomale). Enfin, nous avons isolé des fibroblastes embryonnaires murins provenant d'embryons possédant soit le gène *Abcb5* *wild-type*, soit *knock-out*, afin d'étudier par la suite le rôle d'ABCB5 dans la cellule.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: Jean-Pierre Gillet

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier toutes les personnes qui ont lu ou vont lire ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance au Professeur Jean-Pierre Gillet pour son accueil au sein de son laboratoire de Biologie moléculaire du cancer ainsi que pour ses bons conseils, ses nombreuses corrections et son suivi tout au long de ces dix mois de mémoire. Je remercie également mes trois partenaires de bureau : Géraldine Sana, avec qui j'ai appris et réalisé de nombreuses manipulations dans le domaine de la localisation de la protéine d'intérêt de ce travail ; Marie Fourrez qui a été disposée à m'aider, en toutes circonstances; et Lucie Poncelet, mémorante, avec qui j'ai partagé les galères mais aussi les bons moments liés à la réalisation de ce mémoire. Merci également à Jean-Martin Billard qui m'a énormément aidée quant à la gestion des souris et à qui j'ai souvent demandé conseil. Un tout grand merci pour votre bonne humeur et tous les bons moments passés en votre compagnie !

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire de Chimie physiologique et tout particulièrement le Professeur Michel Jadot et Marielle Boonen pour les nombreux conseils qu'ils m'ont donnés et sans qui je n'aurais jamais su interpréter les résultats de fractionnement et de dosages. Merci aussi à Virginie Tevel et Florentine Gillis qui m'ont appris à réaliser un fractionnement et les dosages enzymatiques associés.

J'aimerais également exprimer ma gratitude à toute l'équipe du laboratoire de Génétique moléculaire à qui j'ai emprunté beaucoup de matériel et qui était toujours disposée à m'aider lorsque j'en avais besoin.

Finalement, je remercie ma famille qui m'a supportée tout au long de ce travail et tout particulièrement Sylvie, mon parrain et ma maman qui ont passé du temps à relire ce manuscrit en quête de fautes de ponctuation et d'orthographe. Un tout grand merci à Maxime pour son soutien et sa patience durant ces dix mois de travail intense.

Table des matières

Liste des abréviations	3
I. Introduction.....	5
1. Le mélanome.....	5
2. Les mélanocytes et leur régulation	6
2.1 Rayons ultraviolets et dommages à l'ADN	7
2.2 Les mélanosomes.....	7
2.3 Synthèse de la mélanine.....	8
2.4 Régulation de la synthèse de la mélanine	9
3. Les facteurs de risque du mélanome.....	10
3.1 Exposition aux UV	10
3.2 Phototype	10
3.3 Nombre de nævi.....	11
4. Développement du mélanome	11
4.1 CDKN2A/CDK4.....	11
4.2 Gènes impliqués dans la voie MAPK.....	12
4.3 PTEN	13
5. Progression et pronostic.....	14
6. Traitement.....	16
6.1 Chimiothérapie	16
6.2 Immunothérapie.....	17
6.3 Immunomodulation et thérapie ciblée	17
7. Les transporteurs ABC.....	18
7.1 Structure et mécanisme.....	19
7.2 La famille des ABCB.....	21
7.3 ABCB5	22
8. Objectifs de ce mémoire	23
II. Matériel et méthodes	25
1. Génotypage des souris	25
2. Traitement des souris avec du 4-hydroxytamoxifène	26
3. Préparation d'un lysat cellulaire et isolation de la fraction mitochondriale	26
4. Isolation des membranes totales	27
5. Fractionnement subcellulaire.....	27

6. Dosages enzymatiques	28
6.1 β -galactosidase.....	28
6.2 α -glucosidase	28
6.3 Phosphodiesterase alcaline	28
6.4 Cytochrome oxydase	28
6.5 Lactate déshydrogénase	29
7. Western blot.....	29
8. Quantification des résultats obtenus par western blot	30
9. Isolation de fibroblastes embryonnaires murins	30
10. Immortalisation de fibroblastes embryonnaires murins.....	30
11. Mesure de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence	30
12. Courbe de survie suite à un traitement des MEFs à la doxorubicine.....	31
III. Résultats	32
1. Vérification <i>in vivo</i> du caractère suppresseur de tumeur d'ABCB5.....	32
2. Localisation intracellulaire d'ABCB5	35
2.1 Localisation possible d'ABCB5 dans la mitochondrie.....	35
2.2 Fractionnement subcellulaire de cellules A375 WT et dosages enzymatiques	36
2.3 Western blot détectant la présence d'ABCB5 dans les fractions de cellules A375WT	39
3. Rôle d'ABCB5 dans la cellule.....	40
3.1 Isolation de fibroblastes embryonnaires murins et mesure de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence.....	40
3.2 Evaluation de la survie des MEFs suite à leur exposition à une dose croissante de doxorubicine	40
IV. Discussion et perspectives	42
1. Vérification <i>in vivo</i> du caractère suppresseur de tumeur d'ABCB5.....	42
2. Localisation intracellulaire d'ABCB5	43
3. Rôle d'ABCB5 dans la cellule.....	47
V. Conclusion.....	48
Bibliographie	49

Liste des abréviations

ABC : *ATP-binding cassette*
ACTH : adrénocorticotrophine
ADN: acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP: adénosine diphosphate
AIC: 5-aminoimidazol-4-carboxamide
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ARN(m): acide ribonucléique (messenger)
ASIP: *agouti signaling protein*
ASR: activité spécifique relative
ATP: adénosine triphosphate
CD28: *cluster of differentiation 28*
CDK (4 ou 6): *cyclin-dependent kinase*
CDKN2A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
CMH-I: complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CRE: *cAMP response element*
CREB: *cAMP response element-binding protein*
CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*
DOPA: 3,4-dihydroxyphénylalanine
DTIC: dacarbazine
ERK: *extracellular signal-regulated kinase*
FDA: *Food and Drug Administration*
FGF: *fibroblast growth factor*
GDP: guanosine diphosphate
GRB2: *growth factor receptor-bound protein 2*
GSK3: *glycogen synthase kinase 3*
GTP: guanosine triphosphate
HGF: *hepatocyte growth factor*
HSP90: *heat shock protein 90*
ICL: loops intracellulaires
IFN- α : interféron- α
IGF-1: *insulin-like growth factor-1*
IgG: immunoglobuline G
IL-2: interleukine-2
kDa: kilodalton
KO: *knock-out*
MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
MC1R: *melanocortin 1 receptor*
MEFs: fibroblastes embryonnaires murins
MEK: *mitogen-activated protein kinase kinase*
Mg²⁺: magnésium

MITF: *microphthalmia-associated transcription factor*
MTIC: monométhyle triazenoimidazole carboxamide
NAD(H): nicotinamide adénine dinucléotide
NBD: domaine de liaison à l'ATP
NK: *natural killer*
PK1: *phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1*
PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2: phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA: protéine kinase A
RB: protéine du rétinoblastome
RGP: phase de croissance radiale
SCF: *stem cell factor*
shRNA: *small hairpin RNA*
TCR: *T cell receptor*
TMD: domaine transmembranaire
TRP-1: *tyrosinase-related protein 1*
UV: ultraviolet
VGP: phase de croissance verticale
WT: *wild-type*
 α -MSH: mélanocortine

I. Introduction

1. Le mélanome

La peau, barrière protectrice du corps, est composée de l'épiderme et du derme. L'épiderme est un épithélium kératinisé composé de cinq couches, dont les kératinocytes constituent le type cellulaire principal (**Fig. 1**). La couche basale (ou germinative) est la plus profonde et présente une seule assise de cellules cylindriques dont l'activité mitotique assure le renouvellement de l'épiderme. Elle est suivie de la couche épineuse, appelée ainsi par la présence de nombreux desmosomes (épines) reliant entre eux les kératinocytes. Les cellules présentent également une activité mitotique importante. Ensuite, on observe une couche granuleuse caractérisée par la présence, au sein des cellules, de granules de kératohyaline, protéine précurseur de la kératine. La couche granuleuse est surmontée d'une très fine couche dite « claire » où les cellules présentent de l'éléidine, un produit de la transformation de la kératohyaline. La dernière couche est la couche cornée ; les kératinocytes y sont remplis de kératine mais ne présentent plus de noyau ni d'organites. Un phénomène de desquamation y est également observé, qui consiste à éliminer les couches superficielles afin d'assurer le remplacement des cellules par de nouvelles, produites grâce à l'activité mitotique des cellules des couches basale et épineuse. Il est important de signaler que l'épithélium non kératinisé ne présente pas de couche claire et possède une couche granuleuse incomplète (1).

Quatre types cellulaires sont retrouvés au niveau de l'épiderme : les kératinocytes, qui ont déjà été cités, les mélanocytes, présents au niveau de la couche basale, qui synthétisent la mélanine, les cellules de Langerhans qui sont des cellules présentatrices d'antigènes se trouvant au niveau de la couche épineuse, et les cellules de Merkel, associées à des terminaisons nerveuses afférentes et constituant des récepteurs du toucher, surtout présentes dans la couche basale aux extrémités des doigts (1, 2).

Le derme est constitué essentiellement de tissu conjonctif et, plus particulièrement, de fibres de collagène et de fibres élastiques. On distingue une couche papillaire et une couche réticulaire ; la première étant lâche et présentant des papilles dermiques renfermant des terminaisons nerveuses et des vaisseaux sanguins, la seconde étant plus dense (1).

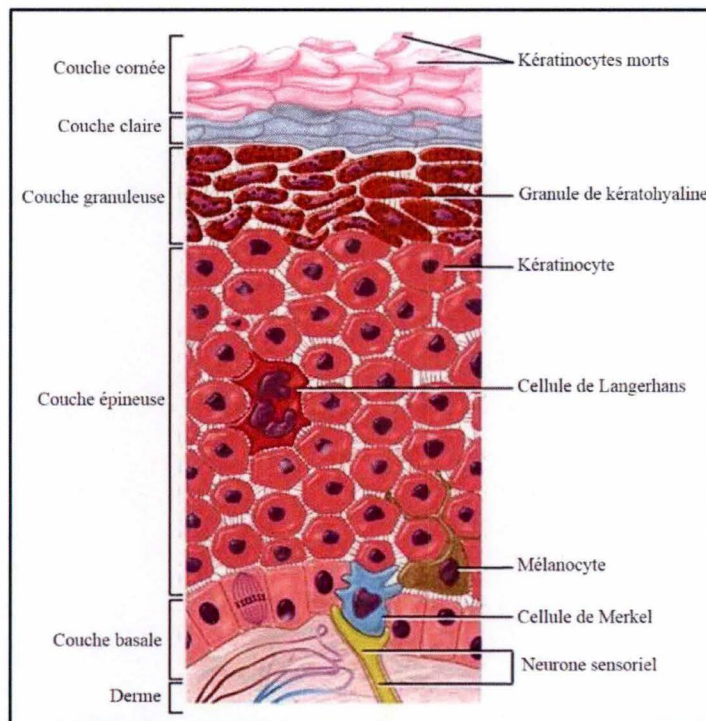


Figure 1 : Structure de la peau. La peau est constituée du derme et de l'épiderme. Ce dernier, composé principalement de cellules appelées kératinocytes, présente cinq couches au niveau des épithéliums kératinisés. De la couche la plus profonde à la plus superficielle, on distingue la couche basale, constituée d'une seule couche de cellules et présentant une activité mitotique importante afin d'assurer le renouvellement de tous les kératinocytes de l'épiderme. Des mélanocytes, assurant la synthèse de la mélanine, ainsi que des cellules de Merkel, formant des mécanorécepteurs, sont également présents au niveau de la couche basale. Cette dernière est surmontée d'une couche épineuse appelée ainsi par la présence de desmosomes, jonctions cellulaires, formés par les kératinocytes. Ensuite, une couche granuleuse est observée, caractérisée par la présence de granules de kératohyaline, précurseur de la kératine. La couche la plus superficielle est la couche cornée sujette à la desquamation où les kératinocytes sont remplis de kératine et ne présentent plus d'organites. Finalement, entre ces deux couches, se trouve une couche claire, fine et translucide. Il est important de signaler que l'épithélium non kératinisé, ne possède pas cette couche claire et présente une couche granuleuse incomplète. *D'après(3).*

Comme tout organe, la peau peut être le lieu de développement d'un cancer. On en distingue d'ailleurs trois types principaux: le carcinome basocellulaire, le carcinome spinocellulaire et le mélanome malin. Environ 75% des cas de cancer de la peau diagnostiqués sont des carcinomes basocellulaires, 20% sont des carcinomes spinocellulaires et les 5% restants correspondent au mélanome malin (4-6). Les deux premiers touchent les kératinocytes et, malgré leur forte incidence, métastasent peu et présentent donc un faible taux de mortalité (7, 8). En revanche, le mélanome malin, touchant les mélanocytes, est un cancer très agressif (9). En 2012, environ 82 000 personnes ont contracté cette maladie au sein de l'Union européenne (dont 2000 en Belgique) et 16 000 décès ont été rapportés (dont 300 en Belgique) (10).

2. Les mélanocytes et leur régulation

Les mélanocytes, dérivés des mélanoblastes, eux-mêmes originaires de la crête neurale, sont des cellules pigmentées se trouvant notamment au niveau de la peau (épiderme) et des yeux (uvéa), mais aussi au niveau des muqueuses (bouche, anus, œsophage, vagin, urètre, etc.) et des méninges (9, 11-13). Ce travail se focalise uniquement sur les mélanocytes présents au niveau de la peau. Ceux-ci sont situés dans la couche basale de l'épiderme ainsi que dans les follicules pileux et sont moins abondants que les kératinocytes avec un ratio d'environ 1/10 (9, 14).

2.1 Rayons ultraviolets et dommages à l'ADN

Lors d'une exposition au soleil, la peau est soumise au rayonnement ultraviolet (UV). On distingue les UVA (320-400 nm), les UVB (290-320 nm) et les UVC (200-290 nm). Bien que ces derniers soient normalement complètement absorbés par l'atmosphère et n'atteignent donc pas la surface de la Terre, ce n'est pas le cas pour les UVA et une partie des UVB qui, eux, peuvent y parvenir. Les photons de ces deux rayonnements peuvent même traverser les différentes couches de la peau et être absorbés, par exemple, par l'ADN. En ce qui concerne les UVB, l'absorption peut résulter en la formation de dimères cyclobutaniques de pyrimidines ou de pyrimidines (6-4) pyrimidones, des dommages qui, s'ils ne sont pas réparés, peuvent induire des mutations (2, 15).

2.2 Les mélanosomes

Outre le fait de déterminer la pigmentation de la peau et des cheveux, les mélanocytes assurent également une protection contre les dommages causés par les UV. Ils produisent, en effet, un pigment appelé mélanine dans leurs mélanosomes (16, 17). Ces organites de grande taille (~500 nm de diamètre) ont une structure proche des lysosomes (18). En effet, tout comme eux, les mélanosomes ont un milieu interne acide ($\text{pH} < 5$) (19), la capacité de fusionner avec le phagosome (20) et présentent des hydrolases lysosomales (β -glucuronidase, β -galactosidase, β -hexosaminidase et cathepsine B entre autres) (21) ainsi que des protéines membranaires également retrouvées au niveau des lysosomes, telles que LAMP-1, -2 et -3 (22, 23). Ils possèdent aussi des protéines qui leur sont propres, importantes pour la synthèse de la mélanine, comme les enzymes tyrosinase, dopachrome tautomérase et TRP-1 (ou TYRP-1, *tyrosinase-related protein 1*), dont les rôles seront développés par la suite, ou PMEL17 (23, 24).

La maturation des mélanosomes est divisée en quatre étapes (17). Ces organites sont formés à partir d'endosomes précoces (18, 25) qui constituent la première étape (I). Ceux-ci sont non pigmentés et contiennent des vésicules semblables à celles observées au niveau des endosomes tardifs. À ce stade, la protéine PMEL17 est présente à la fois dans la membrane de l'endosome et dans celle des vésicules internes, et elle va jouer un rôle important. En effet, cette protéine, composée de deux fragments, $\text{M}\alpha$ et $\text{M}\beta$, est clivée grâce à une proprotéine convertase présente dans la lumière des vésicules. Le fragment $\text{M}\alpha$ est libéré dans la lumière du mélanosome immature et peut alors s'associer avec d'autres fragments $\text{M}\alpha$ pour former des fibrilles (25). Celles-ci, organisées de façon parallèle, sont caractéristiques de l'étape II et donnent un aspect strié au mélanosome. Au stade II, les enzymes impliquées dans la synthèse de la mélanine sont également transférées au mélanosome via des vésicules provenant soit du réseau trans-golgien, soit d'exosomes précoces en fonction des différentes hypothèses formulées (25). Le troisième stade est caractérisé par la synthèse de la mélanine ainsi que par sa fixation au niveau des fibrilles. Ce pigment peut s'y fixer jusqu'à ce que le mélanosome devienne complètement opaque, c'est le stade IV (18, 25).

Une fois matures, les mélanosomes sont transportés de la région périnucléaire des mélanocytes vers l'extrémité de leurs dendrites suivant un système en deux temps. D'abord, le mélanosome se fixe à une protéine motrice, la kinésine, qui va se déplacer sur un microtubule

vers une dendrite du mélanocyte. Une fois arrivé à l'extrémité de celle-ci, l'organite se détache du microtubule et se lie aux filaments d'actine présents sous la membrane plasmique, à l'extrémité des dendrites, grâce à une petite GTPase, RAB27A, qui forme un complexe avec la mélanophiline et la myosine Va (18, 26). Lorsque les mélanosomes se trouvent à proximité de la membrane plasmique du mélanocyte, ils peuvent être transférés à environ trente-six kératinocytes voisins. Les mélanosomes se répartissent alors autour du noyau de façon à absorber le rayonnement ultraviolet (14, 16). Le mécanisme de transfert n'est pas encore élucidé, mais plusieurs hypothèses ont été formulées telles que la cytophagocytose de l'extrémité de la dendrite par les kératinocytes, l'exocytose de la mélanine, des mélanosomes ou de parties de mélanocytes suivie de leur phagocytose, la fusion des membranes plasmiques des deux types cellulaires ou le transfert via la formation de vésicules. Il semblerait que l'hypothèse d'exocytose-phagocytose soit la plus probable (27, 28). De plus, un récepteur membranaire présent à la surface des kératinocytes, PAR-2, jouerait un rôle dans le transfert en stimulant le phénomène de phagocytose de ces cellules (27, 29).

2.3 Synthèse de la mélanine

Deux types de mélanine sont produits par les mélanocytes, l'eumélanine de couleur brun noir et la phéomélanine de couleur jaune rouge. La proportion de ces deux pigments détermine la pigmentation de la peau (14, 16). Lorsque la phéomélanine est exposée au rayonnement ultraviolet, elle peut donner naissance à des sous-produits tels que des espèces réactives de l'oxygène pouvant endommager l'ADN ; c'est pourquoi la présence en grande quantité de ce pigment peut constituer un facteur de risque des cancers de la peau (16, 30).

L'eumélanine et la phéomélanine sont produites au départ d'un acide aminé, la L-tyrosine (**Fig. 2**). La voie de synthèse débute par une oxydation, catalysée par l'enzyme tyrosinase, de la L-tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) puis en dopaquinone. Si de la cystéine est disponible, elle va réagir avec la dopaquinone pour former soit de la 5-S-cysteinyl-dopa ou de la 2-S-cysteinyl-dopa et ces deux-ci, après oxydation et polymérisation, vont former la phéomélanine. En revanche, s'il n'y a pas de cystéine disponible, la dopaquinone va connaître une cyclisation intramoléculaire résultant en la formation de dopachrome et celui-ci est soit tautomérisé, grâce à la dopachrome tautomérase, en acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique, soit décarboxylé en 5,6-dihydroxyindole. Ces molécules sont ensuite respectivement oxydées par la *tyrosinase-related protein 1* et la tyrosinase pour former des quinones, précurseurs de l'eumélanine (14, 31, 32).

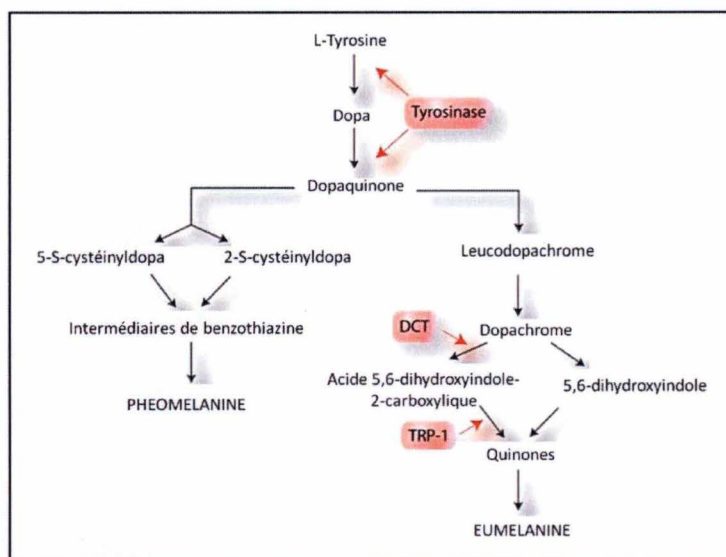


Figure 2 : Voie de synthèse de la phéo- et eumélanine. Le point de départ est l'oxydation par l'enzyme tyrosinase de la L-tyrosine en dopaquinone en passant par la Dopa. La dopaquinone peut alors être utilisée de deux manières différentes. D'une part, si de la cystéine est présente, elle va s'y lier pour former de la 5-S-cystéinyldopa et de la 2-S-cystéinyldopa qui, après oxydation et polymérisation, formeront la phéomélanine. Par contre, en l'absence de cystéine, du dopachrome se forme, suite à une cyclisation intramoléculaire de la dopaquinone. Le dopachrome va soit être tautomérisé par l'action de la dopachrome tautomérase (DCT) et donner de l'acide 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylique, soit être décarboxylé et ainsi former du 5,6-dihydroxyindole. Enfin, par l'action de la tyrosinase et de TRP1, ces deux molécules seront oxydées, menant à la synthèse d'eumélanine. D'après (2).

2.4 Régulation de la synthèse de la mélanine

Les kératinocytes sont fortement impliqués dans la régulation de la mélanogenèse. En effet, lors d'une exposition aux UV, ils produisent et libèrent de la mélanocortine (α -MSH) et de l'adrénocorticotrophine (ACTH), deux hormones qui se lient à un récepteur à la surface des mélanocytes, MC1R. Cette liaison induit, via une protéine G, l'activation d'une adénylate cyclase qui convertit de l'ATP en AMPc dont l'accumulation active, à son tour, la protéine kinase A (PKA). Cette protéine transloque ensuite dans le noyau et phosphoryle la protéine CREB qui va pouvoir se lier à CRE se trouvant dans le promoteur du gène codant pour le facteur de transcription MITF. Après phosphorylation par ERK1 ou 2, ce facteur stimule la transcription des gènes de la tyrosinase, de la dopachrome tautomérase et de TRP-1, les trois principales enzymes impliquées dans la synthèse de l'eumélanine (**Fig. 3**) (16, 33, 34). Il existe cependant un antagoniste du récepteur MC1R, l'ASIP (*agouti signaling protein*), qui empêche la liaison de l' α -MSH au récepteur MC1R et favorise la production de phéomélanine (14, 35).

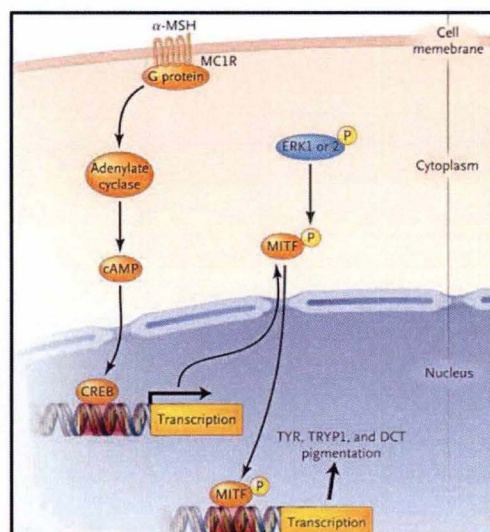


Figure 3 : Voie d'activation du facteur de transcription MITF, déterminant dans le phénomène de mélanogenèse. Lorsque l'hormone α-MSH est synthétisée et libérée par les kératinocytes de l'épiderme, elle peut se lier aux récepteurs MC1R présents dans la membrane plasmique des mélanocytes. Cette liaison engendre alors l'activation par une protéine G de l'adénylate cyclase qui convertit de l'ATP en AMPc. L'accumulation de ce dernier résulte en l'activation de la protéine kinase A (non représentée) qui active à son tour CREB en la phosphorylant. Celle-ci peut alors se lier à l'élément CRE se trouvant dans le promoteur du gène codant pour le facteur de transcription MITF. Ce dernier, après phosphorylation par ERK1 ou 2, peut stimuler la transcription des gènes codant pour la tyrosinase, la dopachrome tautomérase et la TRP-1 impliquées dans la synthèse d'eumélanine. *D'après (36).*

3. Les facteurs de risque du mélanome

3.1 Exposition aux UV

L'exposition au rayonnement ultraviolet constitue un facteur de risque important. Comme dit précédemment, les ces rayons peuvent avoir des effets délétères sur notre ADN, ce qui risque d'être à l'origine de mutations. Cependant, il semble qu'en fonction du type d'exposition, la propension à développer un mélanome n'est pas la même. En effet, il a été démontré qu'une exposition chronique et à long terme aux UV, rencontrée, par exemple, chez des personnes exerçant un travail d'extérieur, favorise la mise en place d'une protection contre les dommages à l'ADN. Une exposition dite intermittente associée à des coups de soleil, lors d'une période de vacances à l'étranger par exemple, quant à elle, augmenterait les risques de développer un mélanome (36–38). De plus, une forte exposition menant à l'apparition fréquente de coups de soleil durant l'enfance accroîtrait également les risques (2, 37, 39).

3.2 Phototype

En 1975, Fitzpatrick a créé une classification des différents types de peau permettant de déterminer leur sensibilité au rayonnement ultraviolet (40). Il a ainsi défini six phototypes (**Table 1**) en se basant sur la couleur de la peau, des yeux et des cheveux, la présence de taches de rousseur et la réaction de la peau lorsqu'elle est exposée aux UV (bronzage et coups de soleil). Ces phototypes constituent un facteur de risque étant donné qu'il existe une corrélation entre ceux-ci et la susceptibilité de développer un mélanome (41, 42). En effet, une méta-analyse réalisée en 2010 rapporte qu'une personne présentant un phototype I ou II a deux fois plus de risques de développer un mélanome en comparaison à un phototype IV, tandis qu'une personne de phototype III a 35% de risques supplémentaires (43).

Table 1 : Détails des différents phototypes décrits par Fitzpatrick en 1975 (40).

Phototypes	Peau	Cheveux	Yeux	Taches de rousseur	Réaction aux UV	
					Bronzage	Coups de soleil
I	Très claire	Blonds ou roux	Clairs (bleus)	Oui	Pas	Chaque fois
II	Très claire	Blonds ou châains	Clairs (verts, bleus, noisettes)	Apparition suite à exposition au soleil	Difficile	Souvent
III	Claire	Blonds ou châains	Clairs	/	Progressif	Parfois
IV	Mate	Châains ou bruns	Foncés	/	Facile	Peu
V	Foncée	Bruns	Foncés	/	Facile	Rarement
VI	Noire	Noirs	Foncés	/	/	Jamais

3.3 Nombre de nævi

La présence en grande quantité de nævi sur le corps est aussi considérée. En effet, une personne ayant plus de cent nævi sur le corps aurait 7,6 fois plus de risques d'être atteinte d'un mélanome qu'une personne présentant seulement une dizaine de grains de beauté. En outre, si plus de cinq nævi atypiques ou dysplasiques sont observés, le risque de développer un mélanome est six fois plus important en comparaison à une absence de ce type de grains de beauté (37, 44).

4. Développement du mélanome

L'initiation ainsi que la progression du mélanome peuvent être attribuées à une dérégulation d'un équilibre existant entre la prolifération des cellules souches mélanocytaires et leur différenciation en mélanocytes. Ce déséquilibre est dû à des mutations dans des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. Une mutation gain de fonction d'un proto-oncogène suivie de l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur sont à l'origine du développement d'un mélanome (45, 46). Certains de ces gènes sont décrits dans la suite de ce travail.

4.1 CDKN2A/CDK4

CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) est un gène suppresseur de tumeur qui code pour deux protéines, p16^{INK4a} et p14^{ARF} (p19^{ARF} chez les souris), grâce à deux promoteurs différents et au phénomène d'épissage alternatif (9, 47, 48). Leur rôle dans la cellule est de stopper le cycle cellulaire ou d'induire l'apoptose quand l'ADN est endommagé, quand des proto-oncogènes sont activés ou quand les cellules sont vieilles. Ainsi, ces protéines seraient impliquées dans le mécanisme de sénescence qui constituerait une protection contre le développement d'un cancer (9, 36, 49, 50).

p16^{INK4a} intervient au niveau du point de contrôle entre les phases G1 et S du cycle cellulaire et se lie au complexe formé par CDK4 et CDK6, qui ne peut alors plus phosphoryler la protéine du rétinoblastome (RB). Cela mène à la séquestration du facteur de transcription E2F et donc à la non-activation des gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire en phase S (**Fig. 4**).

p14^{ARF}, quant à lui, se lie à la protéine MDM2 qui, dès lors, ne peut plus se lier au domaine de transactivation de p53. Ce dernier n'est plus ubiquitinylé et s'accumule dans la cellule. Cette accumulation conduit à l'arrêt du cycle cellulaire via l'inhibition de Cdk4 et à l'apoptose (**Fig. 4**) (9, 36, 51–53). On comprend donc que, lorsque le gène *CDKN2A* est muté, le contrôle de la prolifération cellulaire ainsi que de l'apoptose sont dérégulés.

Il est important de souligner que 10% des mélanomes sont dits familiaux et donc héréditaires et que, parmi les personnes atteintes, 25 à 40% présentent une mutation de *CDKN2A* contre 0,2 à 2% chez les patients atteints d'un mélanome sporadique (51, 54). Il arrive également que ce soit le gène codant pour CDK4 qui est muté, ce qui empêche l'interaction entre la protéine et p16^{INK4a} (36, 55).

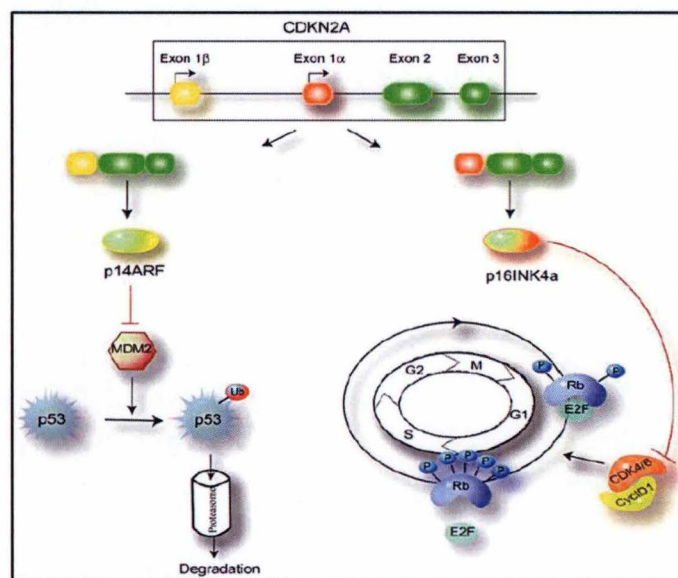


Figure 4 : Actions de INK4A et ARF, deux protéines encodées par le gène suppresseur de tumeur, *CDKN2A*. INK4A et ARF sont issues d'un épissage alternatif d'un même Arn messenger. A gauche : ARF se lie à MDM2 qui ne peut dès lors plus se lier à la protéine p53. Il n'est donc plus ubiquitinylé et s'accumule dans la cellule. La cellule meurt par apoptose. A droite : INK4A se lie au complexe composé de CDK4 et CDK6, ce qui mène à la séquestration du facteur de transcription E2F par Rb qui n'est plus phosphorylée. Les gènes nécessaires à la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire ne sont plus activés. D'après (2).

4.2 Gènes impliqués dans la voie MAPK

Il arrive également que des proto-oncogènes soient mutés. C'est le cas de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie des MAP (*mitogen-activated protein*) kinases (MAPK). La voie débute par la liaison d'un facteur de croissance (FGF, SCF, HGF, etc.) à un récepteur tyrosine kinase qui engendre la dimérisation ainsi que la transphosphorylation du récepteur. Ensuite, une protéine à domaine SH2 (GRB2 par exemple)

se lie à une tyrosine du récepteur et recrute une protéine cytosolique appelée SOS. Celle-ci se lie à RAS, une petite protéine G attachée au feuillet interne de la membrane plasmique, et induit un changement conformationnel ainsi que le remplacement de GDP par du GTP au sein de RAS. Une cascade de phosphorylation s'ensuit, débutant avec l'ajout d'un phosphate à RAF qui, elle-même, phosphoryle MEK qui ajoute, à son tour, un phosphate à ERK, ces trois protéines étant des kinases. Finalement, l'activation de ERK engendre sa translocation dans le noyau et la phosphorylation de facteurs de transcription qui sont impliqués, par exemple, dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie des mélanocytes (**Fig. 5**) (9, 46, 51).

Il existe trois protéines RAS (HRAS, KRAS et NRAS) ainsi que trois protéines RAF (ARAF, BRAF et CRAF) mais les mutations les plus fréquemment retrouvées dans le cas d'un mélanome concernent NRAS et BRAF. En effet, pour NRAS, la mutation Q61L est constatée dans environ 15% des mélanomes tandis que la substitution d'une valine par un glutamate en position 600 (V600E) dans le gène codant pour BRAF est observée dans 50% des cas. Le résultat de ces mutations est une suractivité des protéines concernées (jusqu'à sept cents fois pour ^{V600E}BRAF) et donc une prolifération ainsi qu'une survie excessives (9, 36, 46, 56).

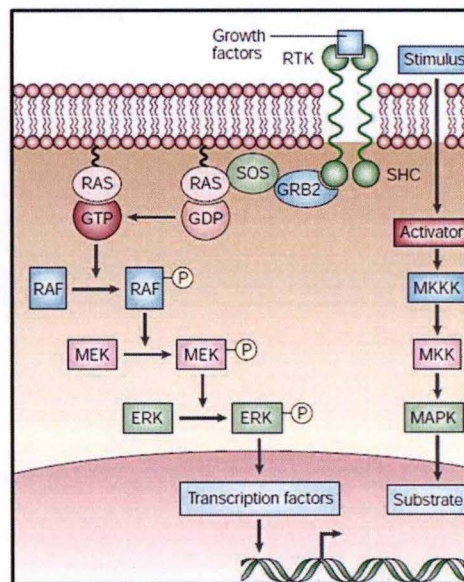


Figure 5 : Voie de signalisation MAPK. Lorsqu'un facteur de croissance se lie à un récepteur tyrosine kinase à la surface d'une cellule, le récepteur dimérise et est transphosphorylé. La protéine cytosolique SOS peut alors s'y lier et va induire un changement conformationnel de RAS, permettant le remplacement du GDP en GTP en son sein. S'ensuit alors une cascade de phosphorylation composée de RAF, MEK et ERK. Une fois phosphorylé, ce dernier transloque dans le noyau et peut y phosphoryler des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la survie des mélanocytes. D'après (51).

4.3 PTEN

Un autre gène suppresseur de tumeur, muté dans environ 30% des mélanomes, est *PTEN* (57, 58). Ce gène est un régulateur négatif de la voie de signalisation PI3K/AKT qui est impliquée dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire. Comme pour la voie des MAP kinases, c'est la liaison d'un facteur de croissance (HGF ou IGF-1 par exemple) à un

récepteur tyrosine kinase qui constitue l'élément déclencheur. L'activation du récepteur permet la liaison de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui, une fois activée, transforme le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). PIP3 recrute alors la protéine AKT qui est activée par la *phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1* (PDK1). Celle-ci peut, en retour, phosphoryler d'autres acteurs comme BAD ou GSK3 et ainsi stimuler la prolifération cellulaire ou inhiber la mort cellulaire programmée. PTEN, contrairement à PI3K, convertit le PIP3 en PIP2, diminuant ainsi la prolifération cellulaire ou augmentant l'apoptose (**Fig. 6**) (36, 57, 59, 60).

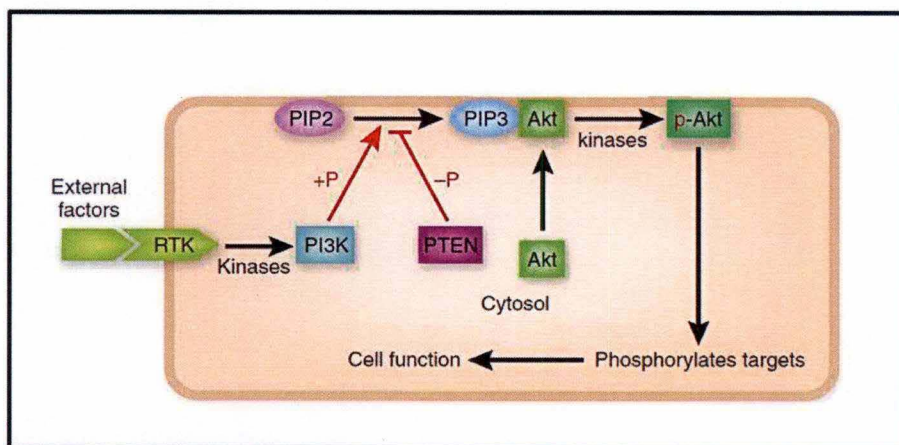


Figure 6 : Action de PTEN sur la voie de signalisation PI3K/AKT. L'activation de la voie se fait par la liaison d'un facteur de croissance à un récepteur tyrosine kinase. Lorsqu'il se lie, le récepteur dimérise et est transphosphorylé, ce qui permet la liaison de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui transforme le PIP2 en PIP3. Cette transformation entraîne le recrutement de la protéine AKT qui va être activée par la kinase PDK1 (non représentée sur la figure) et va ainsi pouvoir phosphoryler d'autres acteurs et stimuler la prolifération cellulaire ou inhiber l'apoptose. D'après (61).

5. Progression et pronostic

À ce jour, deux méthodes sont utilisées pour caractériser la progression du mélanome. La plus récente, le modèle de Clark (62), divise le processus de mélanomagenèse en cinq étapes en fonction d'observations histologiques (**Fig. 7**). La première étape est caractérisée par l'apparition d'un nævus bénin dans l'épiderme. Celui-ci est formé au départ de mélanocytes structurellement normaux qui prolifèrent de façon anormale. Généralement, la progression s'arrête à ce stade en raison de la sénescence des cellules mais il arrive que le nævus évolue en nævus atypique, représentant la deuxième étape. Celle-ci est caractérisée par des mélanocytes dysplasiques ainsi que par une croissance aberrante des cellules. Une phase de croissance radiale (RGP) est ensuite observée, la lésion croît alors latéralement au sein de l'épiderme et, bien que les cellules ne possèdent pas encore la capacité de métastaser, elles peuvent passer au travers de la membrane basale et proliférer dans le derme papillaire. Il faut attendre la quatrième étape, la phase de croissance verticale (VGP), pour que les cellules puissent former des métastases. La lésion croît de façon perpendiculaire à la RGP et les cellules sont aptes à envahir tout le derme où elles peuvent rejoindre les vaisseaux lymphatiques et sanguins afin de former une tumeur à un autre endroit plus ou moins distant de la tumeur primaire, phénomène appelé métastase qui constitue l'ultime étape du modèle (9, 36, 41, 62).

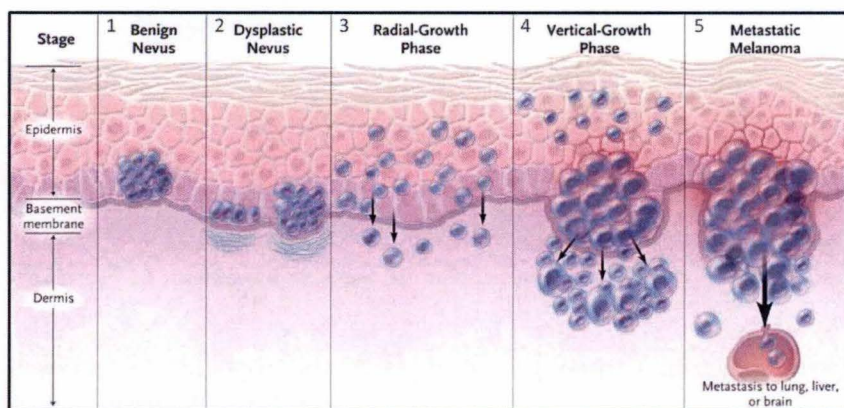


Figure 7 : Représentation des cinq étapes du modèle de Clark. La première étape (1) est l'apparition d'un nævus bénin composé de mélanocytes qui prolifèrent de manière anormale. Il arrive souvent que la progression s'arrête à ce stade en raison de la sénescence des cellules. Cependant, le nævus peut également devenir atypique et présenter des mélanocytes dysplasiques et une croissance aberrante des cellules, c'est la seconde étape. Ensuite, on observe une phase de croissance radiale (RGP) (3) où, comme son nom l'indique, la tumeur croît latéralement et les cellules peuvent même passer au travers de la membrane basale et atteindre le derme papillaire. Après la RGP, une phase de croissance verticale (VGP) (4) a lieu, les cellules sont dès lors capables de métastaser et la lésion croît perpendiculairement à la RGP. Une fois dans le derme, les cellules peuvent rejoindre les vaisseaux lymphatiques et sanguins et former des tumeurs à des endroits distants de leur point d'origine, on parle alors de mélanome métastatique (5). *D'après (36).*

Plus tôt, en 1970, Breslow avait proposé une méthode qui s'appuie sur la mesure de l'épaisseur de la tumeur, à partir de la couche granuleuse de l'épiderme jusqu'à la cellule de mélanome la plus distale. Plus l'épaisseur est grande, moins le pronostic est bon. En effet, une épaisseur inférieure à 0,76 mm assure au patient une survie à cinq ans de 100% tandis que, lorsque la tumeur présente une épaisseur supérieure à 3 mm, la survie à cinq ans chute alors à 22,2% (6, 63, 64).

À ce jour, l'AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) a instauré les critères TNM (**Table 2**) pour évaluer le stade de la maladie, un système utilisant à la fois le modèle de Clark et l'indice de Breslow. Le critère T regroupe l'épaisseur de la tumeur ainsi que son ulcération et son taux de mitoses. Le deuxième critère, N, quant à lui, représente l'atteinte ou non d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques. Enfin, le critère M concerne la présence ou non de métastases dans des organes distants et le niveau de gravité est fonction de l'organe touché.

Au total, il existe neuf stades différents (de I à IV) en fonction de la combinaison des trois critères et il est évident que plus le stade est avancé moins le pronostic de survie est bon (les patients atteints d'un mélanome de stade IA ont un taux de survie à cinq ans de 93% contre moins de 15% pour ceux atteints d'un stade IV) (6, 65, 66).

Table 2 : Détails des différents critères TNM instaurés par l’AJCC. Tis : représente un cancer dit *in situ*, les cellules croissent dans la couche superficielle du tissu ; NA : non applicable ; LDH : lactate déshydrogénase. D’après (6, 66).

T			N			M		
	Epaisseur (mm)	Ulcération/mitoses		Nbr. de ganglions	Etendues des métastases		Localisation	LDH
Tis	NA	NA	N0	0	NA	M0	Pas de métastase à distance	NA
T1	≤1	(a) Sans ulcération et mitoses <1/mm ² (b) Avec ulcération ou mitoses ≥1/mm ²	N1	1	(a)Micrométastases (b)Macrométastases	M1a	Peau, tissus sous-cutanés ou ganglions lymphatiques	Normal
T2	1,01-2	(a) Sans ulcération (b) Avec ulcération	N2	2-3	(a)Micrométastases (b)Macrométastases (c) Métastases satellites ou en transit	M1b	Poumon	Normal
T3	2,01-4	(a) Sans ulcération (b) Avec ulcération	N3	<4 métastases en transit		M1c	Toutes les autres métastases distantes	Elevé
T4	>4	(a) Sans ulcération (b) Avec ulcération						

6. Traitement

Une personne atteinte d’un mélanome est généralement face à deux cas de figure quand il s’agit de son traitement. Soit le mélanome est primaire et est soigné par résection chirurgicale, soit il est déjà à un stade plus avancé, présente des métastases, et est alors presque toujours incurable. En effet, ce type de cancer est résistant aux traitements couramment utilisés, qu’il s’agisse de radiothérapie, d’immunothérapie ou de chimiothérapie (9, 41, 67). De plus, la survie du patient est fortement influencée par le lieu des métastases : une localisation au niveau du foie, du cerveau ou des os est associée à une survie plus courte en comparaison à des métastases au niveau du tractus intestinal (68, 69). Le fait que le patient soit âgé, de sexe masculin, ou présente un grand nombre de métastases entre aussi en ligne de compte (69, 70) .

6.1 Chimiothérapie

Parmi les agents chimiothérapeutiques couramment utilisés (étoposide, dacarbazine, taxol, cisplatine, etc.), seule la dacarbazine (DTIC) est considérée comme agent de référence pour le traitement du mélanome (9, 71). La DTIC (5-[3,3-diméthyl-1-triazenyl]-imidazole-4-carboxamide), un agent alkylant, est administrée au patient par injection intraveineuse. La molécule doit alors être activée par le cytochrome P450, une enzyme du foie, qui la transforme en monométhyl triazenoimidazole carboxamide (MTIC). Celui-ci, très instable, réagit avec l’eau pour former deux composés, du 5-aminoimidazol-4-carboxamide (AIC) et du méthyldiazonium. Ce dernier va attaquer l’oxygène en position six d’une guanine de l’ADN et ainsi le méthyliser pour former une O⁶-méthylguanine. Cette base nucléique modifiée se lie préférentiellement à une thymine plutôt qu’à la cytosine attendue. Ce mauvais appariement résulte *in fine* en l’apoptose de la cellule concernée (72–74). Ce traitement est

plutôt utilisé dans un but palliatif étant donné le faible taux de réponse des patients (environ 15%), ainsi que le mince avantage de survie qu'il leur confère (six à huit mois) (75, 76). Même en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques ou avec l'immunothérapie, la survie du patient n'est pas prolongée (75).

L'inefficacité de la dacarbazine et de la chimiothérapie peut être en partie attribuée au type cellulaire touché dans le cas du mélanome. En effet, les mélanocytes auraient une meilleure capacité de survie par rapport à d'autres types cellulaires et, en devenant tumoraux, ils présenteraient un faible taux d'apoptose. Étant donné que les agents chimiothérapeutiques agissent majoritairement via le phénomène de mort cellulaire programmée, on comprend dès lors pourquoi la chimiothérapie ne constitue pas un traitement très efficace (77).

6.2 Immunothérapie

Comme son nom l'indique, l'immunothérapie vise à stimuler le système immunitaire. Une des molécules utilisées dans le cas du mélanome est l'interféron alpha-2b (IFN- α). Une fois administrée, cette molécule agit sur de nombreux paramètres qui peuvent avoir une action anti-tumorale. En effet, IFN- α , d'une part, agit sur les cellules tumorales et leur stroma et permet une meilleure identification de ces cellules par le système immunitaire ; d'autre part, il active les cellules du système immunitaire telles que les macrophages, les lymphocytes NK ou les cellules dendritiques, par exemple, qui vont tenter d'éliminer les cellules tumorales. De plus, la présence de l'interféron peut aussi mener à l'apoptose (via p53) ou à l'inhibition de la croissance des cellules tumorales (78). Bien que ce traitement ait été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*, États-Unis) pour les mélanomes de stades II et III, il n'en demeure pas moins que le taux de réponse observé est faible (22% dont 4% de réponse complète) et que le médicament a peu d'effets sur la survie. En outre, la toxicité de ce traitement n'est pas négligeable (6, 79, 80).

En ce qui concerne les mélanomes de phase IV, une autre molécule, l'interleukine 2, (IL-2) qui stimule les lymphocytes NK ainsi que les lymphocytes T et mène à la libération de nombreuses cytokines (IFN- α en fait partie), a été approuvée par la FDA en 1998. L'IL-2 présente une toxicité semblable à l'IFN- α mais, malgré, un taux de réponse de 16%, 44% des patients qui répondent affichent une survie de plus de cinq ans (6, 69, 81).

6.3 Immunomodulation et thérapie ciblée

Afin de tenter d'améliorer la survie des patients, d'autres thérapies moins conventionnelles ont été développées : l'immunomodulation et la thérapie ciblée.

L'ipilimumab est un anticorps IgG1 monoclonal qui reconnaît et bloque le CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*). Ce dernier se trouve à la surface des lymphocytes T et, tout comme CD28, peut se lier au récepteur B7 sur la membrane plasmique des cellules présentatrices d'antigène. Ainsi, en fonction de la liaison de CD28 ou CTLA-4, le signal de costimulation est soit positif ou négatif, respectivement, et active ou inhibe l'activation et la prolifération du lymphocyte T lié. L'ipilimumab a pour rôle de « masquer » le CTLA-4 (6, 82). Ce traitement a été évalué par une étude de phase II qui a montré un taux de réponse de

17% et une survie d'environ 16 mois tandis qu'une étude de phase III a démontré que lorsque l'Ipilimumab est administré aux patients en combinaison avec du DTIC, leur survie est augmentée de deux mois en comparaison au DTIC couplé à un placebo (83, 84).

En ce qui concerne la thérapie ciblée, le Vemurafenib, un médicament oral, semble être prometteur. Comme nous l'avons mentionné, les enzymes de la voie des MAP kinases sont souvent mutées dans le cas du mélanome. Plus spécialement BRAF, dont la mutation V600E est retrouvée dans 50% des cas. C'est cette mutation que le Vemurafenib cible. En effet, cet inhibiteur enzymatique a la particularité de se lier et d'inactiver seulement ^{V600E}BRAF, ce qui mène au blocage de la prolifération des cellules concernées et à leur apoptose (85, 86). Lorsque le Vemurafenib a été comparé à la dacarbazine dans une étude de phase III, il a été montré que le taux de réponse des patients au Vemurafenib était presque dix fois plus important que celui de la dacarbazine (48% contre 5%). De plus, 84% des patients traités avec l'inhibiteur étaient en vie après 6 mois contre 64% de ceux ayant reçu le DTIC (87). Cependant, après 6 mois, on observe une rechute chez les patients, due à l'apparition de mécanismes de résistance qui permettent de réactiver la voie de signalisation (67, 88). De plus, un autre problème est que l'inhibiteur activerait la voie dans les cellules ne possédant pas de mutation de BRAF, ce qui engendrerait le développement d'autres cancers (67, 89). Pour tenter de pallier ces problèmes, la combinaison du Vemurafenib avec un inhibiteur de MEK, comme le Trametinib, est envisagée (67).

7. Les transporteurs ABC

Le manque d'efficacité des traitements peut être attribué à plusieurs mécanismes de résistance (90). On distingue notamment les protéines appelées ABC transporteurs qui sont associées à un phénomène de multirésistance aux médicaments (résistance à plusieurs médicaments à la fois, structurellement et fonctionnellement différents) en transportant ceux-ci hors des cellules tumorales ou en les séquestrant dans des organites (91, 92).

Les transporteurs ABC (pour *ATP-binding cassette*) utilisent l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter leurs substrats au travers de la membrane plasmique ou des membranes des organites (93, 94). Ils constituent une grande famille de protéines membranaires aussi bien retrouvées chez les procaryotes (bactéries) (95) que chez les eucaryotes (levures, plantes, champignons, animaux) (94, 96, 97).

Les transporteurs ABC humains sont au nombre de quarante-huit, répartis en sept familles (de A à G) (93, 98).

7.1 Structure et mécanisme

Les ABC transporteurs sont composés de deux types de domaines. Pour que les transporteurs soient fonctionnels, il faut que chacun d'eux soit présent en double exemplaire, donc que quatre domaines soient assemblés. D'une part, ils possèdent deux domaines transmembranaires (TMD), hydrophobes, constitués d'hélices- α . Chaque TMD en présente typiquement six (99). De longs loops intracellulaires (ICL) ($\sim 25\text{\AA}$) sont également observés au niveau du cytoplasme entre chaque hélice (100). Le rôle de ces domaines est de lier le substrat et de former un canal permettant le passage de celui-ci (99). Leur séquence parmi tous les transporteurs ABC est peu conservée, ce qui reflète la diversité de substrats qui peuvent être liés (99, 100). D'autre-part, les transporteurs ABC sont également composés de deux domaines de liaison à l'ATP (NBD), localisés dans le cytoplasme, qui permettent d'hydrolyser cette molécule et d'ainsi fournir l'énergie nécessaire au transport. Contrairement aux TMD, leur séquence est hautement conservée. Ils possèdent deux sous-domaines, un semblable à la structure retrouvée chez la protéine RecA (101) et un domaine hélicoïdal (102). Chaque sous-domaine présente des motifs conservés. On distingue, au niveau du sous-domaine RecA qui est constitué de deux feuillets β et six hélices α , les motifs Walker A (GxxGxGK(S/T) , x étant variable) et B (hhhhD , h représentant un acide aminé hydrophobe) (103, 104). Le domaine hélicoïdal, composé de 3 à 4 hélices α , est spécifique des ABC transporteurs et est caractérisé par la présence du motif LSGGQ (entre les deux Walker), du loop Q et du motif H qui, comme leurs noms l'indiquent, contiennent, respectivement des glutamines (huit ou neuf) et une histidine (99, 103, 105). Tous ces domaines jouent un rôle soit dans l'hydrolyse de l'ATP, soit dans la structure des NBDs. Il est important de mentionner que, pour hydrolyser l'ATP, les deux NBDs doivent former un dimère. Ainsi, deux molécules d'ATP se lient à l'interface des deux domaines, dans des sites bordés du motif Walker A d'un NBD et du motif LSGGQ de l'autre. Ces deux motifs vont lier l'ATP en interagissant avec les phosphates de la molécule (103, 106). Le motif H exerce la même fonction en formant un pont hydrogène avec le phosphate γ de l'ATP (103, 107). Les glutamines du loop Q permettent à la fois le contact avec un domaine transmembranaire en interagissant avec un long loop intracellulaire de ce dernier (ICL2) (100, 105), et la liaison avec le magnésium (Mg^{2+}) (cofacteur) et l'eau qui permettent l'hydrolyse de l'ATP (99, 108). Finalement, le motif Walker B, via son aspartate conservé, interagit également avec Mg^{2+} (108).

Comme dit précédemment, pour être fonctionnel, un ABC transporteur doit avoir deux TMD et deux NBD. Soit ces domaines sont fusionnés pour donner un seul polypeptide et on parle alors d'ABC transporteurs présentant une topologie typique « full-length », soit seuls deux domaines (un de chaque type) sont fusionnés (le TMD est attaché de manière N- ou C-terminale au NBD) et dans ce cas, le demi-transporteur doit former un homo- ou hétérodimère pour être fonctionnel (93, 99).

En ce qui concerne le mécanisme de transport de ces transporteurs, deux modèles ont été proposés suite à l'étude d'ABCB1. Dans les deux cas, la liaison du substrat est l'élément déclencheur du mécanisme. Le premier modèle (**Fig. 8A**), proposé par Higgins et ses collègues (109), stipule que, lorsque le substrat se lie au niveau des deux domaines

transmembranaires, un changement conformationnel se produit au niveau des NBD (soit un déplacement du motif Walker A, soit un alignement du motif LSGGQ), changement qui augmente la capacité de ceux-ci à lier l'ATP. Deux molécules peuvent alors s'y lier et les NBD forment un dimère ce qui mène à un changement de conformation des TMD et à une diminution de l'affinité du site de liaison du substrat pour celui-ci qui est alors libéré. Ensuite, les deux molécules d'ATP sont hydrolysées et la présence d'ADP+Pi dans les poches de liaison aux nucléotides engendre des répulsions électrostatiques entre l'ADP et le motif Walker A d'une part, et entre le Pi et le motif LSGGQ d'autre part. Ces répulsions mènent à la libération de l'ADP et de Pi et au désassemblage du dimère ; le transporteur reprend sa conformation de départ.

Le deuxième modèle (**Fig. 8B**), proposé par Sauna et son équipe (110), présente un mécanisme un peu différent. En effet, pour eux, lorsque le substrat se lie à son site de liaison, il entraîne la liaison d'une molécule d'ATP au niveau des NBDs. C'est l'hydrolyse de celle-ci qui induit la libération du substrat de l'autre côté de la membrane. L'ADP et le phosphate inorganique générés sont ensuite libérés et une deuxième molécule d'ATP vient se fixer et est hydrolysée afin de fournir l'énergie nécessaire au retour du transporteur dans son état initial (110, 111).

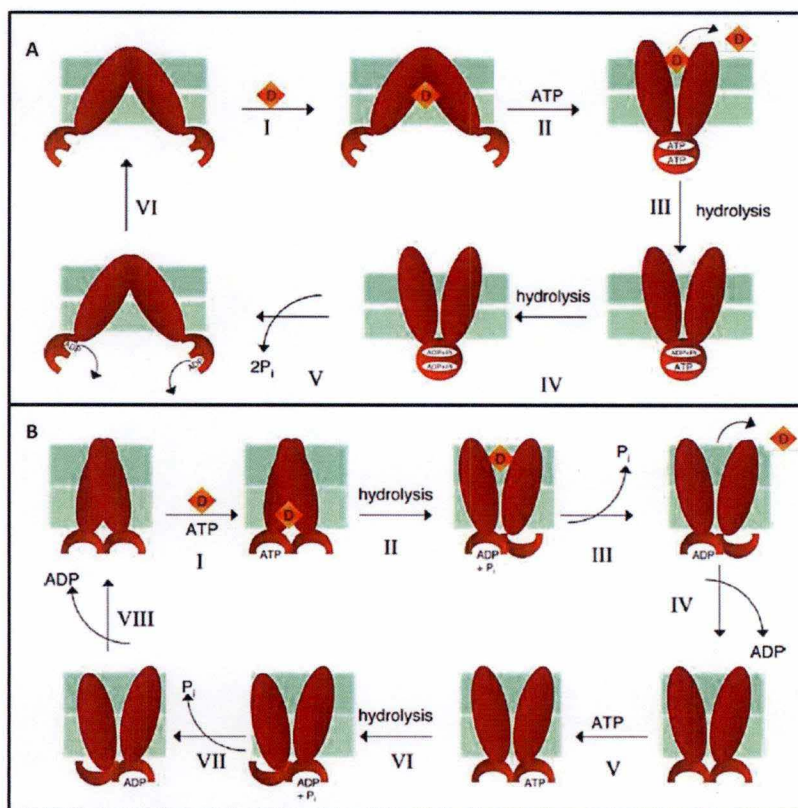


Figure 8 : Représentation des deux modèles proposés pour le mécanisme de transport des ABC transporteurs. Le premier modèle (A) stipule que, lorsque le substrat se lie aux domaines transmembranaires (TMDs) (I), cela engendre un changement de conformation des domaines de liaison à l'ATP (NBDs) qui peuvent lier deux molécules d'ATP et former un dimère (II). Lors de la formation de ce dimère, l'affinité des TMDs pour le substrat diminue et il est libéré. Ensuite, les deux molécules d'ATP sont hydrolysées (III et IV), les deux ADP+Pi formés sont libérés (V) et le transporteur reprend sa conformation initiale (VI). Le deuxième modèle (B) propose que, lorsque le substrat se lie aux TMDs, une première molécule se lie aux NBDs (I) et l'hydrolyse de celle-ci mène à la libération du substrat (II et III). Ensuite, une deuxième molécule d'ATP se lie (V) et c'est son hydrolyse en ADP+Pi (VI) et leur libération (VII et VIII) qui ramène le transporteur dans sa conformation initiale (VIII). D'après (111).

7.2 La famille des ABCB

La famille B des transporteurs ABC est particulièrement importante dans le cadre de ce travail. Cette famille compte onze membres (de 1 à 11) dont seulement quatre présentent une topologie typique « full-length ». Sept membres sont des demi-transporteurs (93, 94).

ABCB1, découvert en 1976 par Juliano et Ling (112), est le premier transporteur ABC humain à avoir été identifié et reste le plus étudié à ce jour (97, 113). Ce transporteur « full-length » exprimé notamment au niveau du foie, des reins, de l'intestin et de la barrière hémato-encéphalique, est un acteur bien connu dans le phénomène de multirésistance aux médicaments. Par exemple, en 1987, Gottesman et son équipe (114) ont montré que, lorsqu'ils induisaient une surexpression du gène codant pour ABCB1 (=MDR1) dans des cellules 3T3 (souris) ou KB (homme) grâce à un ADNc, celles-ci étaient résistantes à la colchicine, la doxorubicine et la vinblastine. Par la suite, de nombreux autres composés ont été ajoutés à la liste tels que les anthracyclines (famille de la doxorubicine), les taxanes (paclitaxel et docétaxel), les vinca-alcaloïdes (famille de la vinblastine) et les épipodophyllotoxines (étoposide) (92, 115).

ABCB2 et 3, plus connus sous le nom de TAP1 et 2, sont des demi-transporteurs qui forment un hétérodimère. Ceux-ci sont présents au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique de la plupart des cellules et jouent un rôle dans l'immunité (92, 93). En effet, lorsqu'une cellule est infectée par un virus par exemple, les protéines de celui-ci peuvent être dégradées en peptides grâce au protéasome. Ces peptides peuvent alors se lier au dimère formé par TAP1 et 2 et être transportés dans le réticulum endoplasmique où se trouve le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Un peptide viral se lie à ce CMH-I, complète ainsi son repliement et l'ensemble est exporté vers la surface externe de la membrane plasmique. Grâce à l'interaction du CMH-I lié au peptide et d'un récepteur (TCR) présent à la surface d'un lymphocyte TCD8, ce dernier est activé et peut induire l'apoptose de la cellule infectée par le virus (93, 116).

ABCB4, quant à lui, est localisé au niveau des hépatocytes et a pour fonction de transporter, dans les canalicules biliaires, du cholestérol ainsi que de la phosphatidylcholine qui entrent dans la composition de la bile (117, 118). ABCB11, se trouvant également au niveau des hépatocytes, a une fonction semblable, en exportant des sels biliaires (119).

ABCB6, 7, 8 et 10, sont tous les quatre des demi-transporteurs localisés dans les membranes des mitochondries. ABCB6 se trouve dans la membrane externe et, selon Krishnamurthy et ses collègues (120), est impliqué dans la biosynthèse de l'hème qui se passe en partie dans la mitochondrie. La voie y débute par la réaction d'une glycine avec un succinyl-CoA produit par le cycle de Krebs donnant du δ -Aminolevulinate qui est transporté dans le cytoplasme où il est transformé successivement en porphobilinogène, pré-uroporphyrinogène, uroporphyrinogène III et coproporphyrinogène III. Ce dernier est ensuite transporté dans la mitochondrie où il sera converti en hème en passant par du protoporphyrinogène IX et de la protoporphyrine IX (121). ABCB6 serait impliqué dans le transport du coproporphyrinogène III au travers de la membrane externe de la mitochondrie (120). ABCB7 se trouve, quant à lui,

dans la membrane interne et jouerait un rôle dans la formation de protéines fer-soufre (122). Ces protéines, se trouvant dans le cytosol ou la mitochondrie, sont appelées ainsi parce que leur structure présente un cluster fer-soufre. Au niveau mitochondrial, on retrouve notamment la NADH déshydrogénase et la succinate déshydrogénase qui constituent les deux premiers complexes de la chaîne de transport d'électrons enchâssée dans la membrane interne (121). La synthèse des clusters fer-soufre se passe dans la mitochondrie, mais les différents acteurs impliqués sont encore méconnus. Une enzyme a néanmoins été identifiée chez la levure, Nfs1p, une cystéine désulfurase qui a pour rôle d'extraire le soufre des chaînes latérales de cystéines (123). Selon Kispal et ses collègues (123), ABCB7 exporterait les clusters fer-soufre synthétisés dans la mitochondrie afin de les incorporer dans les protéines fer-soufre cytosoliques. En 2003, une autre fonction a été attribuée à ABCB7 par Taketani et son équipe (124). En effet, ils ont observé une corrélation entre la quantité d'ARNm correspondant à ABCB7 et celle correspondant à l'enzyme ferrochelatase qui catalyse la transformation de protoporphyrine IX en hème ainsi qu'une interaction entre les deux protéines. ABCB7 jouerait donc également un rôle dans la synthèse de l'hème.

ABCB8, localisé dans la membrane interne, serait un canal potassique dépendant de l'ATP qui interviendrait dans le phénomène de pré-conditionnement ischémique, consistant à induire de courtes périodes d'ischémie au sein des cellules du myocarde et neuronales afin de les protéger contre des ischémies futures (125). Une fonction d'exportateur de fer et de glutathion a également été attribuée à ce transporteur ABC par Bayeva et son équipe (126, 127) suite à l'observation d'accumulation de fer, ainsi qu'une augmentation de glutathion dans les mitochondries des cellules cardiaques de souris KO pour *ABCB8*.

ABCB10, également dans la membrane interne, demeure peu caractérisé. Il jouerait un rôle dans la synthèse de l'hémoglobine (122, 128).

Un autre membre des ABCB dont la fonction est peu connue est ABCB9. Ce demi-transporteur se trouvant au niveau des lysosomes est phylogénétiquement proche d'ABCB2 et 3, ce qui suggère que celui-ci pourrait également transporter des peptides (129, 130).

7.3 *ABCB5*

ABCB5 « full-length » est un transporteur structurellement proche d'ABCB1 ayant une masse atomique de 138 kDa (131). Son gène est situé sur le chromosome 7p15 (131). Il est principalement exprimé dans les cellules pigmentées telles que les mélanocytes (et donc les cellules de mélanome) et les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (132). Cependant, la localisation de cette protéine, que ce soit au niveau d'organes ou de types cellulaires bien précis et même intracellulaire, reste à déterminer. Il en va de même pour sa fonction bien que plusieurs chercheurs aient émis certaines hypothèses. D'abord, on a découvert qu'ABCB5 joue un rôle dans le phénomène de chimiorésistance en médiant l'efflux des médicaments hors des cellules. En effet, en 2004, Huang et son équipe (133), montraient que l'inhibition de la transcription des ARN messagers d'ABCB5 grâce à des siRNA, augmentait la sensibilité (de deux à trois fois) de cellules de mélanome (SK-MEL-28) à la camptothécine et au fluorouracile, deux médicaments utilisés en chimiothérapie. Un an plus tard, la même équipe, en travaillant sur des cellules de mélanome G3361, a démontré qu'ABCB5 est aussi impliqué dans l'efflux de la doxorubicine (134). En 2012, Kawanobe et

ses collègues (135) ont également démontré le transport de la doxorubicine par ABCB5 mais également du paclitaxel et du docétaxel, grâce à l'utilisation de cellules HEK293 transfectées. Ensuite, une autre fonction a été proposée pour ABCB5 dans un article de Schatton et son équipe (136) publié en 2008, où la protéine est présentée comme un marqueur de cellules souches de mélanome. Ces cellules, capables d'auto-renouvellement et de différenciation, peuvent initier la tumeur et permettre sa prolifération. De plus, ils ont montré que l'expression d'ABCB5 augmente l'agressivité du mélanome. Par extension, on peut dire qu'ABCB5 est impliqué dans le phénomène de mélanomagenèse. Ce terme ne doit pas être confondu avec la mélanogenèse, un processus regroupant à la fois la biogenèse des mélanosomes, la synthèse de la mélanine ainsi que l'homéostasie de la cytotoxicité induite par la synthèse de la mélanine et plus particulièrement ses intermédiaires et ses sous-produits. Dans une revue de 2009 (131), il est spéculé qu'ABCB5 pourrait être impliqué dans la mélanogenèse en séquestrant certains métabolites produits lors de la synthèse de la mélanine dans les mélanosomes. De plus, comme certains agents anti-cancéreux ciblent la mélanogenèse et augmentent la production de mélanine pour augmenter la cytotoxicité, l'expression d'ABCB5 pourrait ainsi rendre les cellules résistantes à ces médicaments. Une autre hypothèse, formulée en 2003 par la même équipe que celle ayant travaillé sur l'hypothèse du marqueur de cellules souches, est que ABCB5 joue un rôle dans la fusion de cellules progénitrices (137).

Dernièrement, dans un article en cours de publication (138), Jean-Pierre Gillet et ses collègues ont séquencé la région codante du gène *ABCB5* au sein d'échantillons de mélanomes. Ils ont trouvé des mutations récurrentes et ont étudié l'effet de celles-ci dans des lignées cellulaires de mélanomes. Ils ont montré que, lorsque les cellules expriment la protéine ABCB5 mutée ou que son expression est perdue (en utilisant des shRNA), leur prolifération, leur croissance indépendante de l'ancrage et leur capacité d'invasion sont augmentées. A partir de ces observations, ils ont conclu qu'*ABCB5* pourrait être un gène suppresseur de tumeur. De plus, ils ont remarqué que les mutations d'*ABCB5* sont souvent associées à celles des gènes *CDKN2A* et *NRAS*, une information importante pour la suite de ce travail.

8. Objectifs de ce mémoire

Mon projet s'articule suivant trois grands axes. D'abord, il consiste à valider, *in vivo*, l'hypothèse basée sur des données soumises pour publication par Jean-Pierre Gillet et son équipe (138), qui indiquent qu'*ABCB5* est un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le mélanome. Nous nous sommes basés sur ces données et nous avons généré trois souches murines à partir de souris KO pour *Abcb5*, développées par Jean-Pierre Gillet et ses collègues (données non publiées), et de deux souches murines C57BL/6J créées par Huijbers et al. (139) et Ackermann et al. (140), présentant une délétion du gène suppresseur de tumeur (*Cdkn2a*), ou une activation d'un proto-oncogène (*Nras* ou *Hras*). Le but est d'évaluer l'importance de la délétion du gène *Abcb5* dans le développement du mélanome chez ces souris.

Ensuite, afin de mieux comprendre la fonction d'ABCB5 dans la cellule, nous voulions, dans un premier temps, déterminer la localisation intracellulaire de ce transporteur. Des images préalablement obtenues dans le laboratoire (Fig. 9), grâce à la technique

d'immunofluorescence et de microscopie confocale, ont montré qu'il est présent dans la mitochondrie. Nous voulions confirmer ces observations en utilisant, d'une part la technique de western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-ABCB5, et d'autre part, un fractionnement subcellulaire complet suivi de dosages enzymatiques et de western blots.

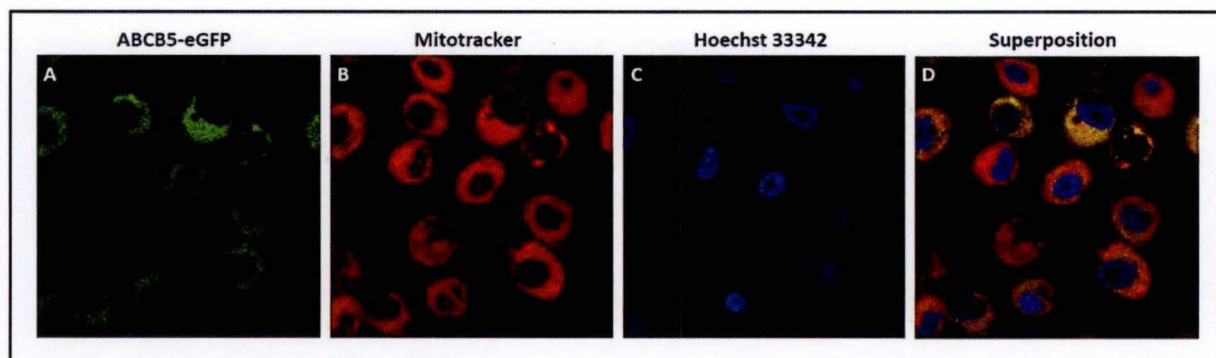


Figure 9 : Analyse au microscope confocal à fluorescence de cellules de mélanome UACC257, infectées avec des particules BacMam contenant un vecteur exprimant le gène codant pour la protéine de fusion ABCB5-eGFP. L'image A montre la fluorescence de la eGFP, donc ABCB5. Les mitochondries (B) et les noyaux (C) ont été marqués avec du Mitotracker et du Hoechst33342, respectivement. La colocalisation est montrée en D.

Enfin, dans le but d'établir un lien entre le caractère suppresseur de tumeur possible d'ABCB5 et sa localisation intracellulaire, donc émettre une hypothèse quant à son rôle dans la cellule, des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) ont été isolés à partir d'embryons *wild-type* (WT) et KO pour *Abcb5*.

II. Matériel et méthodes

1. Génotypage des souris

Le génotypage des trois souches murines a été réalisé par PCR. L'ADN génomique a été isolé à partir d'un bout de queue des souris selon les recommandations du fournisseur du kit « Wizard® Genomic DNA Purification » (Promega, Leiden, Pays-Bas).

En ce qui concerne la souris *knock-out* (KO) pour *Abcb5* et *Cdkn2a* [1], l'amplification de la construction Tyr-iRasP1A a été réalisée en utilisant les primers Ivo021 et CreER1as à une concentration finale de 1 μ M (**Table 3**). Le programme utilisé est le suivant : 3 minutes à 94°C suivies de 40 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 50 secondes à 72°C, l'enchaînement de ces trois étapes étant répété 35 fois pour finir par 2 minutes à 72°C. La taille attendue de l'amplicon est de 586 paires de bases.

Les primers utilisés pour l'amplification de *Ink4a/Arf*^{flox/flox} sont p16III3'-5'S et p16III5'-3'AS à une concentration finale de 1 μ M (**Table 3**). Le programme utilisé est le même que pour la construction Tyr-iRasP1A et la taille attendue de l'amplicon est 350 paires de bases pour l'allèle recombiné et 280 pour l'allèle sauvage.

L'amplification de la construction Tyr::CreER^{T2} a été réalisée en utilisant les primers Tyr-Cre/Ert2transgene1 et Tyr-Cre/Ert2transgene2 à une concentration finale de 500 mM. Un contrôle interne a également été effectué à l'aide de primers TyrCre/Ert2IPCFwd et TyrCre/Ert2IPCRev (**Table 3**) également à une concentration finale de 500 mM. Le programme utilisé est : 3 minutes à 94°C, 35 répétitions de 30 secondes à 94°C, 1 minute à 51,7°C et 1 minute à 72°C, pour finir par 2 minutes à 72°C. La taille attendue pour l'amplicon est de ~100pb et 324pb pour le contrôle interne.

L'amplification du gène *Abcb5*, présent dans les trois souches murines, a nécessité l'utilisation des primers P13_B5cKO_F et P13_B5cKO_R à une concentration finale de 500 nM (**Table 3**). Le programme utilisé est : 3 minutes à 94°C suivies de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute 15 secondes à 72°C, l'enchaînement de ces trois étapes étant répété 29 fois pour finir par 3 minutes à 72°C. Si le gène est sauvage, l'amplicon fait 512 paires de bases tandis que pour l'allèle recombiné, il est de 112 paires de bases.

Pour ce qui est de la souris *knock-out* pour *Abcb5* et présentant la construction Tyr-iRasP1A [2], les mêmes primers (**Table 3**) et les mêmes programmes que pour la souris KO pour *Abcb5* et *Cdkn2a* ont été utilisés à l'exception des primers amplifiant Tyr::CreER^{T2} étant donné que cette construction n'est pas présente.

Le génotypage de la troisième souche murine, KO pour *Abcb5* et possédant un transgène *NRas* [3], a nécessité, en plus des primers déjà utilisés pour *Abcb5*, l'utilisation de primers Tyr-Nras F et Tyr-Nras R à une concentration finale de 1 μ M (**Table 3**). Le programme utilisé est le suivant : 4 minutes à 94°C suivies de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 58°C et 30 secondes à 72°C, l'enchaînement de ces trois étapes étant répété 35 fois pour finir par 5 minutes à 72°C.

Table 3 : Amorces utilisées pour les génotypages.

	Constructions	Amorces	Séquences (5'→3')
	Abcb5	P13_B5cKO_F	GTAACTCCAACCTCTCAGCTAAG
	Abcb5	P13_B5cKO_R	CTCAACAATTTCTATAGCAATTACC
1	Tyr-iRasP1A	Ivo021	AACTGCAGTGGGCAGGTAAGTATCAAGG
	Tyr-iRasP1A	CreER1as	CGCATAACCAGTGAAACAGC
	Ink4a/Arf ^{flox/flox}	p16III3'-5'S	CCTGACTATGGTAGTAAAGTGG
	Ink4a/Arf ^{flox/flox}	p16III5'-3'AS	ACGTGTATGCCACCCTGACC
	Tyr::CreER ^{T2}	Tyr-Cre/Ert2transgene1	GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC
	Tyr::CreER ^{T2}	Tyr-Cre/Ert2transgene2	GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT
	Tyr::CreER ^{T2}	TyrCre/Ert2IPCFwd	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
	(contrôle interne)		
	Tyr::CreER ^{T2}	TyrCre/Ert2IPCRev	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
	(contrôle interne)		
2	Tyr-iRasP1A	Ivo021	AACTGCAGTGGGCAGGTAAGTATCAAGG
	Tyr-iRasP1A	CreER1as	CGCATAACCAGTGAAACAGC
	Ink4a/Arf ^{flox/flox}	p16III3'-5'S	CCTGACTATGGTAGTAAAGTGG
	Ink4a/Arf ^{flox/flox}	p16III5'-3'AS	ACGTGTATGCCACCCTGACC
3	Tyr::N-RasQ61K	Tyr-Nras F	GGCGAAGGCTTCCTCTGTGT
	Tyr::N-RasQ61K	Tyr-Nras R	GGCCAGTTCGTGGGCTTGT

2. Traitement des souris avec du 4-hydroxytamoxifène

Etant donné que seule la génération des souris *knock-out* pour *Abcb5* et *Cdkn2a* était terminée avant la fin de la rédaction de ce mémoire, uniquement celles-là ont été traitées avec du 4-hydroxytamoxifène. Les souris, âgées de sept semaines, ont préalablement été rasées sur une petite zone au niveau du flanc droit et, pendant trois jours successifs, 1 à 2 µl de 4-hydroxytamoxifène dilué dans du DMSO (1,9 mg/ml) ont été étalés à l'aide d'un pinceau sur la zone.

3. Préparation d'un lysat cellulaire et isolation de la fraction mitochondriale

Un lysat cellulaire ainsi qu'une isolation de la fraction mitochondriale ont été préparés au départ de cellules de mélanome hautement pigmentées, MNT1, qui expriment de façon stable la protéine recombinante ABCB5-FLAG. Le culot cellulaire a d'abord été resuspendu dans du tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 8, 0,1% Triton X100, 10 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂) contenant de l'inhibiteur de protéase « Halt Protease Inhibitor Cocktail » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis). Après 5 minutes d'incubation à 37°C et un cycle de congélation-décongélation, la solution a été soniquée (3x10s).

En ce qui concerne la fraction mitochondriale, le kit « Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (with Dounce Homogenizer) » a été utilisé selon les instructions du fournisseur (Abcam, Cambridge, UK).

4. Isolation des membranes totales

L'isolation de membranes totales a été réalisée à partir de cellules de mélanome A375 WT et MNT1 WT. Les cellules étaient cultivées dans des boîtes de 150 cm². Après avoir aspiré le milieu des cellules et les avoir rincées avec du DPBS froid (Lonza, Bâle, Suisse), elles ont été trypsinisées puis centrifugées à 771g pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été remplacé par du PBS et les cellules ont été comptées grâce à un compteur cellulaire Vi-CELL XR (Beckman Coulter, Pasadena, CA, Etats-Unis). Après centrifugation à 771g pendant 10 minutes, le culot cellulaire a été resuspendu dans du tampon de lyse (10 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl et 1 mM MgCl₂) (1ml/10⁷ cellules) supplémenté avec un inhibiteur de protéases « Halt Protease Inhibitor Cocktail » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis). Les cellules ont ensuite été déposées sur glace pendant 10 minutes, gelées rapidement à l'aide de carboglace puis mises à -80°C pendant une heure. Ensuite, elles ont été dégelées à RT puis réincubées sur glace pendant 45 minutes. Après ces cycles de congélation-décongélation, les cellules ont été cassées grâce à 30 passages dans un homogénéiseur de Dounce. Du tampon TSNA (10 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 240 mM of saccharose et 10% glycérol) (3ml/10⁷ cellules) supplémenté avec un inhibiteur de protéases « Halt Protease Inhibitor Cocktail » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) a été ajouté et la solution centrifugée à nouveau à 771g pendant 10 minutes. Le surnageant a ensuite été récupéré pour être centrifugé à 39 000 rpm pendant une heure dans une ultracentrifugeuse OptimaTM LE-80K (Beckman Coulter, Pasadena, CA, Etats-Unis). Le culot a finalement été resuspendu à l'aide d'une aiguille 23g dans 200 µl de TSNA buffer (10 mM Tris HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 240 mM of saccharose et 10% glycérol) supplémenté avec un inhibiteur de protéases « Halt Protease Inhibitor Cocktail » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis).

5. Fractionnement subcellulaire

Une centrifugation différentielle, décrite par de Duve et ses collègues (141), a été utilisée pour fractionner des cellules A375 WT. Les cellules ont d'abord été raclées, placées dans du saccharose 0,25 M et leur membrane plasmique cassée grâce à 15 passages dans un homogénéiseur de Dounce. L'homogénat a ensuite été centrifugé à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (E1) a été transféré dans un nouveau tube et le culot (N) a été resuspendu dans du saccharose 0,25 M, homogénéisé (15 passages, type B) et centrifugé à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (E2) a été ajouté à E1 pour former E et le culot N a été resuspendu dans du saccharose 0,25 M, homogénéisé (5 passages, type B) et un aliquot de E et N a été prélevé puis placé sur glace. Après, le surnageant E, mis dans un tube adapté à l'ultracentrifugation, a été centrifugé dans une centrifugeuse Beckman L7-35 (Pasadena, CA, Etats-Unis) à 8000 rpm à 4°C pendant un nombre de minutes défini par le volume contenu dans le tube. Le surnageant (LPS1) a été transféré dans un autre tube adapté à l'ultracentrifugation et le culot, correspondant à la fraction M, a été resuspendu dans du saccharose 0,25 M. Cette solution a ensuite été centrifugée à 8000 rpm et 4°C. Le culot (M toujours) a été resuspendu dans du saccharose 0,25 M et un aliquot a été prélevé tandis que le surnageant, appelé LPS2, a été ajouté au surnageant prélevé auparavant, LPS1. Cet ensemble a été centrifugé à 25 000 rpm et 4°C pour donner, d'une part, le surnageant PS1 et le culot L. Ce dernier a été resuspendu dans du saccharose 0,25 M, centrifugé à 25 000 rpm et 4°C pour séparer le surnageant PS2, qui a été ajouté à PS1, du culot L. Un aliquot de L a été prélevé et

mis sur glace avant de centrifuger l'ensemble des surnageants PS1 + PS2 à 35 000 rpm et 4°C. Le culot (P) a été resuspendu dans du saccharose 0,25 M et centrifugé à nouveau à 35 000 rpm et 4°C pour donner les fractions S (surnageant) et P (culot).

À la fin du processus de centrifugation différentielle, six fractions ont été récupérées (E, N, M, L, P et S) et les protéines ont été dosées grâce à un kit « Pierce™ BCA™ Protein Assay » (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis), suivant les instructions du fournisseur.

6. Dosages enzymatiques

L'activité de cinq enzymes marqueurs a été dosée: la β -galactosidase (lysosome), l' α -glucosidase (réticulum endoplasmique), la phosphodiesterase alcaline (membrane plasmique), la cytochrome oxydase (mitochondrie) et la lactate déshydrogénase (cytosol).

6.1 β -galactosidase

L'activité de cette enzyme a été mesurée en utilisant son substrat : le 4-Methylumbelliferyl β -D-galactopyranoside (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne). Les échantillons dilués ont été incubés à 37°C pendant 7 heures avec 5 mM de substrat dans 50 mM de tampon citrate (50mM acide citrique monohydrate, 50 mM tri-sodium citrate deshydrate) à pH 4,5 contenant 0,05% de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, Etats-Unis). La réaction a ensuite été stoppée en ajoutant du tampon glycine-NaOH 0,1 M à pH 10,4 et la fluorescence a été mesurée grâce à un fluorimètre VersaFluor™ (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis) à 495 nm.

6.2 α -glucosidase

L'activité de cette enzyme a été mesurée en utilisant son substrat : le 4-Methylumbelliferyl α -D-glucopyranoside (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne). Les échantillons dilués ont été incubés à 37°C pendant 4 heures et 30 minutes avec 1 mM de substrat dans 0,1 M de tampon glycine-NaOH pH 9 contenant 0,04% de Triton X-100 (Promega, Madison, WI, Etats-Unis). La réaction a ensuite été stoppée en ajoutant de la glycine-NaOH 0,1 M à pH 10,4 et la fluorescence a été mesurée grâce à un fluorimètre VersaFluor™ (BioRad, Hercules, CA, Etats-Unis) à 495 nm.

6.3 Phosphodiesterase alcaline

L'activité de cette enzyme a été mesurée en utilisant son substrat : « Thymidine 5'-monophosphate p-nitrophenyl ester sodium salt » (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Les échantillons dilués ont été incubés à 37°C avec le substrat (concentration finale de 1,6 mM) dilué dans 0,1 M de tampon glycine-NaOH pH 9,6, 4 mM d'acétate de zinc et 0,01 M de NaOH jusqu'à ce que la solution prenne une couleur jaune. La réaction a ensuite été stoppée en ajoutant du NaOH 0,1 M et l'absorbance a été mesurée à 400 nm grâce à un spectrophotomètre Lambda 10 (PerkinElmer, Waltham, MA, Etats-Unis).

6.4 Cytochrome oxydase

L'activité de la cytochrome oxydase a été mesurée en utilisant son substrat : « Cytochrome c from equine heart » (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Les échantillons ont d'abord été dilués deux fois dans la solution contenant 1mM de tampon phosphate pH 7,4 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M ; Na_2HPO_4 0,5 M) (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne), 1 mM d'EDTA (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) pH 7,4 et 0,04% de Triton X-100 (Promega,

Madison, WI, Etats-Unis). Ensuite, la solution substrat contenant le cytochrome c (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis), 0,03 M de tampon phosphate pH 7,4 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M ; Na_2HPO_4 0,5 M) et 1mM d'EDTA (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) pH 7,4 a été réalisée. Après ajout de ferricyanure ou de dithionite dans 1ml de la solution substrat, afin d'oxyder ou de réduire le cytochrome c respectivement, l'absorbance de la solution à 550 nm a été ajustée à une valeur d'environ 0,36 grâce à un spectrophotomètre Lambda 10 (PerkinElmer, Waltham, MA, Etats-Unis). Finalement, 50 μl d'échantillon et 1 ml de la solution substrat ont été déposés dans une cuvette réduite et l'absorbance à 550 nm a été mesurée pendant 30 secondes. La mesure a été réalisée au minimum trois fois pour chaque échantillon.

6.5 Lactate déshydrogénase

L'activité de la lactate déshydrogénase a été mesurée en utilisant son substrat: l'acide pyruvique (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis). Une solution a d'abord été préparée contenant 63 mM de Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne), de l'acide pyruvique 1,25 mM et de l'eau distillée. Ensuite, 100 μl de chaque échantillon (dilué ou non en fonction des résultats obtenus) et 800 μl du mélange Tris-acide pyruvique ont été déposés dans une cuvette réduite. Finalement, 100 μl de NADH (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) ont été ajoutés et l'absorbance a été mesurée pendant 3 minutes (en notant les valeurs obtenues après chaque minute écoulée) à 340 nm grâce à un spectrophotomètre Lambda 10 (PerkinElmer, Waltham, MA, Etats-Unis).

7. Western blot

Les protéines contenues dans le lysat cellulaire, la fraction mitochondriale isolée à l'aide du kit « Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (with Dounce Homogenizer) » (confer point 3), les membranes totales et les différentes fractions obtenues par centrifugation différentielle ont été séparées grâce à une électrophorèse SDS-page. Les protéines présentes dans le gel ont ensuite été électro-transférées sur une membrane PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis) et la membrane a été incubée avec un anticorps polyclonal de lapin anti-ABCB5 ($1,29 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Rockland, Gilbertsville, PA, Etats-Unis). Après incubation, la membrane a été lavée avec du TBST (Tris Buffer Saline Tween20) et incubée avec un anticorps secondaire polyclonal anti-lapin couplé à une peroxydase de raifort (HRP) ($8,3 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Dako, Glostrup, Danemark). Finalement, la membrane PVDF a été incubée pendant 5 minutes dans un révélateur SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis), contenant le substrat de la HRP, et la révélation a été réalisée en utilisant des films Amersham HyperfilmTM ECL (GE Healthcare, Fairfield, CT, Etats-Unis) et un imager Fujifilm FPM 100A Desktop Processor (Fujifilm, Minato-ku, Tokyo, Japon).

D'autres anticorps primaires ont également été utilisés : un anticorps monoclonal de souris anti-histone H1 ($2 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) et un cocktail d'anticorps ($0,01 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) « Mitoprofile[®] Mitochondrial Integrity WB antibody cocktail » (Abcam, Cambridge, UK).

8. Quantification des résultats obtenus par western blot

A partir des résultats obtenus par western blot, une quantification a été réalisée à l'aide du programme ImageJ. Le signal de chaque bande a été quantifié et, sur base de ces valeurs, nous avons calculé la quantité totale de protéine ABCB5 ou histone H1 présente dans chaque fraction. Un graphique a finalement été tracé.

9. Isolation de fibroblastes embryonnaires murins

Des souris hétérozygotes pour le gène *Abcb5* KO ont été mises en couples pendant 24 heures puis séparées. Après treize jours, les femelles enceintes ont été euthanasiées par la technique de dislocation cervicale. Leur utérus a été enlevé et placé dans du PBS (Lonza, Bâle, Suisse). Chaque embryon a été ôté de l'utérus et de son sac amniotique, sa tête et sa queue ont été enlevées (pour le génotypage) ainsi que les organes rouges. Le reste du tissu a ensuite été rincé dans du PBS (Lonza, Bâle, Suisse), placé dans un puits d'une plaque 6 puits contenant 2 ml de trypsine-EDTA (Lonza, Bâle, Suisse) et découpé en petits morceaux à l'aide de ciseaux. La plaque a finalement été placée à 37°C pendant 30 minutes et, après incubation, le mélange a été filtré (70 µm) et réparti dans deux T25 contenant 6 ml de milieu DMEM (Lonza, Bâle, Suisse) avec 10% FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 1% Pénicilline/Streptomycine 1X (Lonza, Bâle, Suisse), 1% Na pyruvate (Lonza, Bâle, Suisse), 1% NeAA (Lonza, Bâle, Suisse) et 0,2% 2-Mercaptoéthanol (Gibco, Carlsbad, CA, USA) .

10. Immortalisation de fibroblastes embryonnaires murins

L'immortalisation des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) a été réalisée en utilisant des rétrovirus produits par des cellules BOSC préalablement transfectées avec deux plasmides : pCL-Eco (Addgene, Cambridge, MA, Etats-Unis) et pBABE-zeo largeTcDNA (Addgene, Cambridge, MA, Etats-Unis). De l'Opti-MEM® (Life technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis) et de la Lipofectamine® 2000 (Life technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis) ont été utilisés pour la transfection. Les particules rétrovirales supplémentées avec 0,004 µM de « Polybrene Infection / Transfection Reagent » (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) ont été ajoutées aux MEFs cultivés dans des T25 à 30-40% de confluence dont le milieu a été aspiré. Les cellules ont ensuite été mises dans l'incubateur à 37°C et, après 6 heures, 5 ml de milieu adapté aux MEFs (DMEM, (Lonza, Bâle, Suisse), 10% FBS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 1% Pénicilline/Streptomycine 1X, 1% Na pyruvate (Lonza, Bâle, Suisse), 1% NeAA (Lonza, Bâle, Suisse) et 0,2% 2-Mercaptoéthanol (Gibco, Carlsbad, CA, USA) ont été ajoutés pour diluer le polybrène. Le surlendemain, le milieu a été aspiré et remplacé par du milieu MEFs contenant 350 µg/ml de Zeocin™ Selection Reagent (Life technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis). Pendant deux semaines et tous les trois jours, le milieu supplémenté de Zeocin a été remplacé.

11. Mesure de l'activité β-galactosidase associée à la sénescence

La veille du test, les cellules (MEFs) ont été mises en culture dans une plaque 6 puits. Le lendemain, un tampon citrate/sodium 40 mM à pH6 contenant 0,02 M d'acide citrique (VWR International RADNOR, PA, Etats-Unis) et 0,05 M de NaH₂PO₄.2H₂O (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) a d'abord été préparé. Celui-ci a ensuite été utilisé pour préparer une solution de marquage dont la composition est la suivante : tampon citrate sodium 36 mM ; potassium

ferricyanide 5,7 mM ; potassium ferrocyanide 5,7 mM ; MgCl_2 1,8mM ; NaCl 5,7 mM (Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) et X-gal 0,9 mg/ml. Une dernière solution (10 ml PBS (Lonza, Bâle, Suisse), 80 μl de glutaraldéhyde 25% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, Etats-Unis) et 500 μl de formaldéhyde 35% (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) servant à fixer les cellules a finalement été préparée.

Une fois toutes les solutions prêtes, le milieu de chaque puits a été aspiré et remplacé par du PBS (Lonza, Bâle, Suisse). Ce dernier a ensuite été aspiré et les cellules ont été couvertes avec la solution de fixation pendant 5 minutes à température ambiante. Après incubation, les puits ont été rincés deux fois au PBS (Lonza, Bâle, Suisse) et la solution de marquage a été ajoutée. Finalement les cellules ont été mises à incuber overnight à 37°C, à l'abri de la lumière.

12. Courbe de survie suite à un traitement des MEFs à la doxorubicine

Le jour avant le début de l'expérience en tant que telle, les cellules ont été mises en culture dans une plaque 96 puits à raison de 5000 cellules/puits. Le lendemain, les cellules ont été mises en contact avec une dose décroissante de doxorubicine (9 doses : 1000 à 3,9 nM (dilution 2 en 2)). Après 72h de traitement, du CCK-8 (« Cell countig kit-8 », Dojindo, Kumamoto, Japon) (10 μl /100 μl de milieu) a été ajouté dans chaque puits et après 2 heures et 30 minutes d'incubation à 37°C, l'absorbance de chaque puits a été mesurée à 450 nM grâce à un « SpectraMax i3 Multi-Mode Detection Platform » (Molecular Devices, Sunnyval, CA, Etats-Unis). Une courbe a finalement été tracée avec les valeurs obtenues.

III. Résultats

1. Vérification *in vivo* du caractère suppresseur de tumeur d'ABCB5

Afin d'étudier, *in vivo*, le caractère suppresseur de tumeur d'*Abcb5* dans le cadre du mélanome, trois souches murines ont été générées. Toutes sont *knock-out* pour *Abcb5* et présentent soit une délétion supplémentaire d'un gène suppresseur de tumeur, soit une activation d'un proto-oncogène.

La première souche murine, KO pour les gènes *Abcb5* et *Cdkn2a* (= *Ink4a/Arf*) (**Fig. 10**), a été générée au départ de souris *knock-out* pour *Abcb5* (données non publiées) et d'un modèle murin, TiRP-10B, développé par Huijbers et son équipe (139). Ces souris TiRP-10B possèdent deux constructions. La première est composée d'un gène de fusion floxé, *CreER*, codant pour une recombinaise Cre inducible par du 4-hydroxytamoxifène, suivi du proto-oncogène *Harvey-Ras*^{G12V} et d'un gène codant pour un antigène tumoral, *P1A*. Ces deux-ci sont séparés de *CreER* par un signal de polyadénylation. Toute la construction est placée sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase, spécifique des mélanocytes, et de son amplificateur. Le second transgène correspond au gène *Cdkn2a* dont les exons 2 et 3 sont flanqués de sites loxP (*Ink4a/Arf*^{flox/flox}). Ainsi, lorsque la recombinaise Cre est exprimée, elle recombine les sites loxP entourant son propre gène et les exons de *Cdkn2a*, ce qui mène à l'activation de *HRas* et à la délétion d'*Ink4a/Arf* ainsi qu'au développement de tumeurs chez la souris. Ce modèle a été confirmé par notre laboratoire. En effet, une tumeur d'environ 1,5cm³ s'est développée au niveau du flanc d'une souris femelle TiRP-10B âgée de neuf mois. Des métastases ont également été observées au niveau du foie, à différents endroits de la peau et à proximité de l'œil. Des coupes de la tumeur primaire ont été réalisées ainsi que deux colorations : HES qui marque les noyaux en bleu, le cytoplasme en rouge et le tissu conjonctif en jaune, et Fontana-Masson qui colore la mélanine en noir. Cependant, ces colorations n'étant pas suffisantes pour déterminer si c'était bien un mélanome, les coupes ont été confiées à une pathologiste, Marie-Cécile Nolleveaux, qui a réalisé plusieurs immuno-marquages pour confirmer le diagnostic.

Après de nombreux croisements, deux femelles homozygotes pour les délétions des gènes *Abcb5* et *Cdkn2a* sont nées le 14 septembre 2014. L'une d'elles a été traitée au 4-hydroxytamoxifène à l'âge de sept semaines tandis que l'autre a servi de contrôle. Parallèlement, deux souris KO pour le gène *Abcb5* ont été utilisées de façon similaire, en contrôle. En date du rendu de ce mémoire, aucun développement de tumeurs n'a été observé chez ces souris.

La deuxième souche murine est *knock-out* pour *Abcb5* et présente une activation du proto-oncogène *HRas* (**Fig. 11**). Nous avons également utilisé la souche murine TiRP-10B. En date du 18 décembre, il restait théoriquement un croisement à réaliser pour obtenir cette souris. Une autre souche murine, contrôle, possédant uniquement la construction Tyr-RasP1, devra également être obtenue par la suite. Les animaux seront traités au 4-hydroxytamoxifène pendant trois jours afin de voir si des tumeurs se développent.

La troisième souche murine est *knock-out* pour *Abcb5* et présente cette fois une activation du proto-oncogène *NRas* (**Fig.12**). Elle a été générée à partir de la souris *knock-out* pour *Abcb5* et d'un autre modèle, créé par Ackermann et ses collègues (140), qui possède le gène *NRas* muté placé sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase. Le but était d'obtenir des souris homozygotes pour la délétion des gènes *Abcb5* et *NRas*. En date du 18 décembre, il restait théoriquement un croisement à réaliser pour obtenir cette souris. Après obtention de la souris d'intérêt, elle sera surveillée afin d'observer l'apparition ou non de tumeurs.

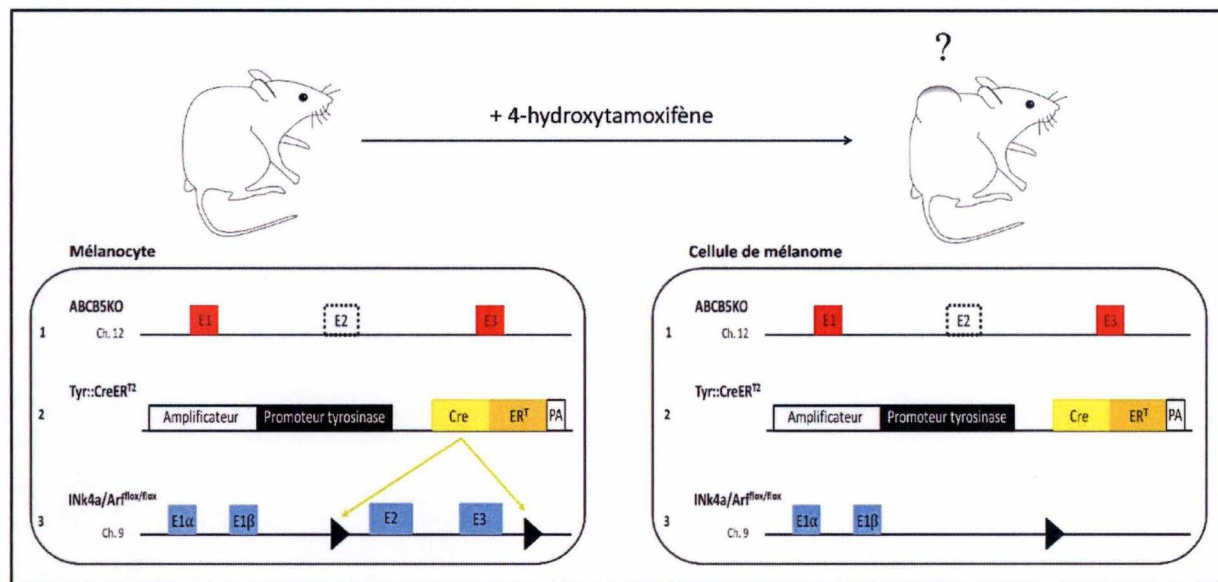


Figure 10 : Génération d'une souris *knock-out* pour les gènes *Abcb5* et *Ink4a/Arf*. Cette souris possède trois constructions. La délétion du gène *Abcb5* s'est faite par l'excision de son exon 2. Le transgène Tyr-Cre/ER^{T2}-13Bos est composé d'un gène de fusion CreER^{T2} placé sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase et de son amplificateur. Ce transgène code pour une recombinaise Cre fusionnée à un récepteur à l'œstrogène muté, exprimée uniquement dans les mélanocytes en raison du promoteur de la tyrosinase. Cette protéine de fusion est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine HSP90 mais l'application de 4-hydroxytamoxifène mène à l'activité de la recombinaise au sein du noyau. La dernière construction est le gène *Ink4a/Arf* dont les exons 2 et 3 ont été floxés. Ainsi, quand la recombinaise Cre est active, ces exons sont excisés.

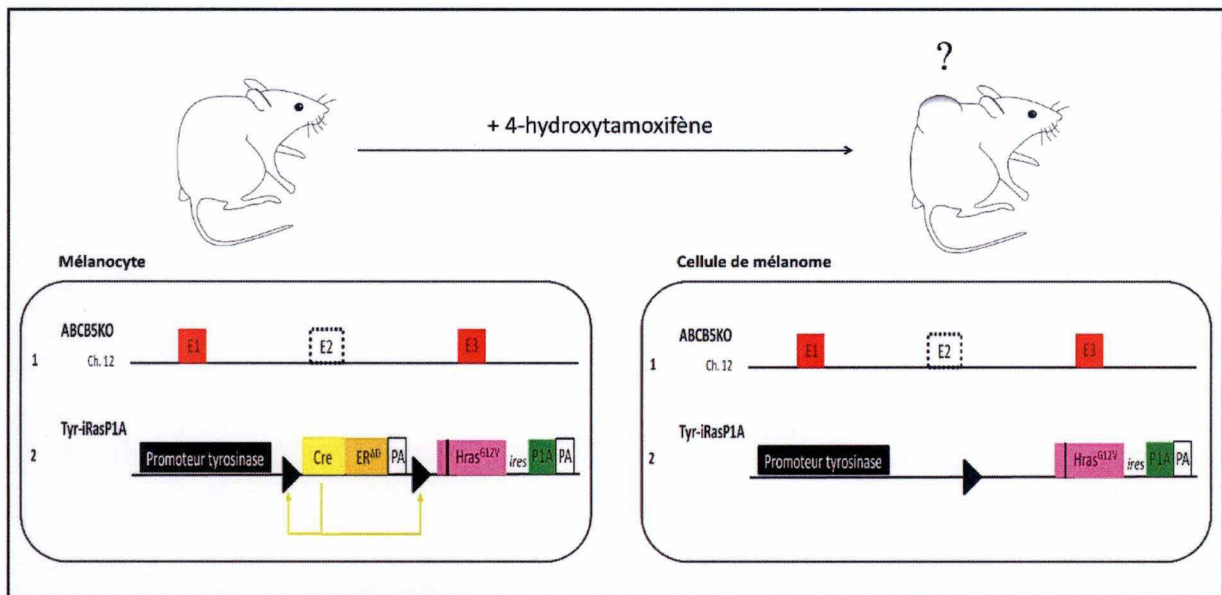


Figure 11 : Génération d'une souris *knock-out* pour *Abcb5* et exprimant *HRas* activé. Cette souris possède deux constructions. La délétion du gène *Abcb5* s'est faite par l'excision de son exon 2. Le deuxième transgène, Tyr-RasP1A, est constitué d'un gène *CreER^{td}* floxé codant pour une recombinaise Cre fusionnée à un récepteur à l'œstrogène muté. Ce gène est suivi du gène *HRas* muté et d'un gène codant pour un antigène tumoral (*P1A*). Le tout est placé sous le contrôle du promoteur de la tyrosinase qui rend l'expression de ces gènes spécifique aux mélanocytes. Sans application de 4-hydroxytamoxifène, la recombinaise Cre est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine HSP90 mais lorsqu'il est administré, la recombinaise peut exciser son propre gène et *HRas* est exprimé.

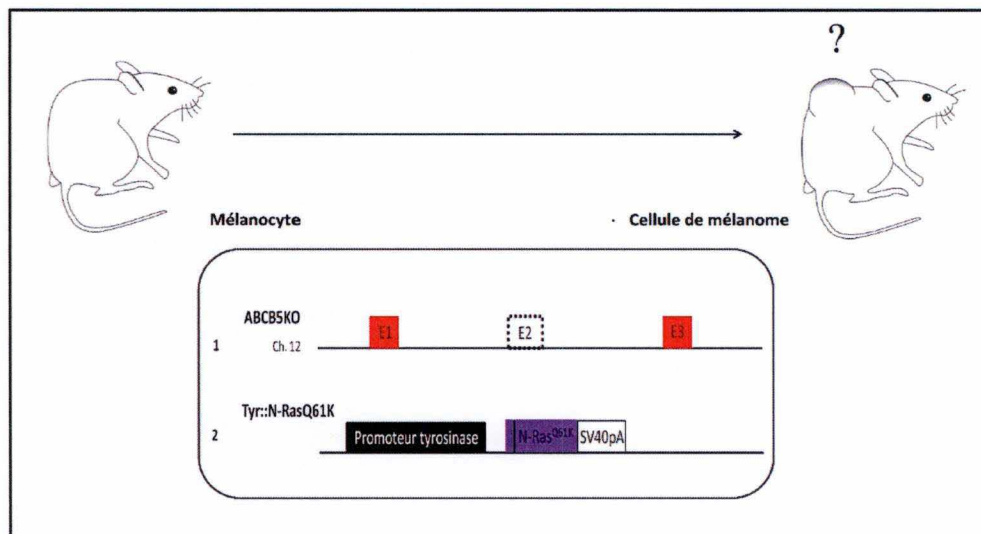


Figure 12 : Génération d'une souris *knock-out* pour *Abcb5* et exprimant *NRas* activé. Cette souris possède deux constructions. La délétion du gène *Abcb5* s'est faite par l'excision de son exon 2. Le deuxième transgène, Tyr::N-RasQ61K, est composé du promoteur de la tyrosinase suivi du gène *NRas* muté et d'un signal de polyadénylation (SV40pA).

2. Localisation intracellulaire d'ABCB5

2.1 Localisation possible d'ABCB5 dans la mitochondrie

Dans des études préliminaires (données non publiées), utilisant l'imagerie confocale (**Fig. 9**), ABCB5 a été localisé dans les mitochondries de plusieurs lignées cellulaires de mélanome exprimant une protéine de fusion ABCB5-eGFP. Afin de valider cette observation, nous avons réalisé un western blot en utilisant un anticorps polyclonal anti-ABCB5 dont la spécificité a été validée par *peptide competition assay* et spectrométrie de masse (données non publiées). Un lysat cellulaire, des membranes totales et une fraction mitochondriale isolée à partir d'un kit, ont été préparés à partir de cellules MNT1 *wild-type* en vue de les déposer en western blot. Des membranes totales, isolées à partir de cellules d'insectes (cellules High Five) transfectées ou non de manière transitoire à l'aide de baculovirus possédant le gène codant pour ABCB5, ont également été utilisées comme contrôles. La **figure 13A** montre le résultat obtenu. Une bande à environ 138kDa, correspondant à la protéine ABCB5, est observée pour tous les échantillons testés sauf, comme attendu, pour le contrôle négatif. Au vu de l'épaisseur des bandes, il semble qu'ABCB5 est présent en plus grande quantité dans le lysat cellulaire, en comparaison aux membranes totales et à la fraction mitochondriale. Mais, étant donné que le prélèvement des différents échantillons était difficile en raison des nombreux pigments présents, cette affirmation doit être considérée avec prudence car il se pourrait que les volumes chargés ne soient pas égaux et donc la quantité de protéines non plus.

Pour ce qui est de la fraction mitochondriale, la plus intéressante dans ce contexte, une fine bande correspondant au poids moléculaire attendu est observée. Bien que ce western blot constitue une donnée préliminaire, il renforce l'hypothèse qu'ABCB5 serait localisé dans les mitochondries mais l'intensité de la bande obtenue pour la fraction mitochondriale suggère qu'ABCB5 pourrait être aussi exprimé dans d'autres organites.

La **figure 13B** présente le profil d'expression de cinq protéines mitochondriales. Les données indiquent la présence et l'intégrité des mitochondries dans la fraction mitochondriale isolée à l'aide d'un kit.

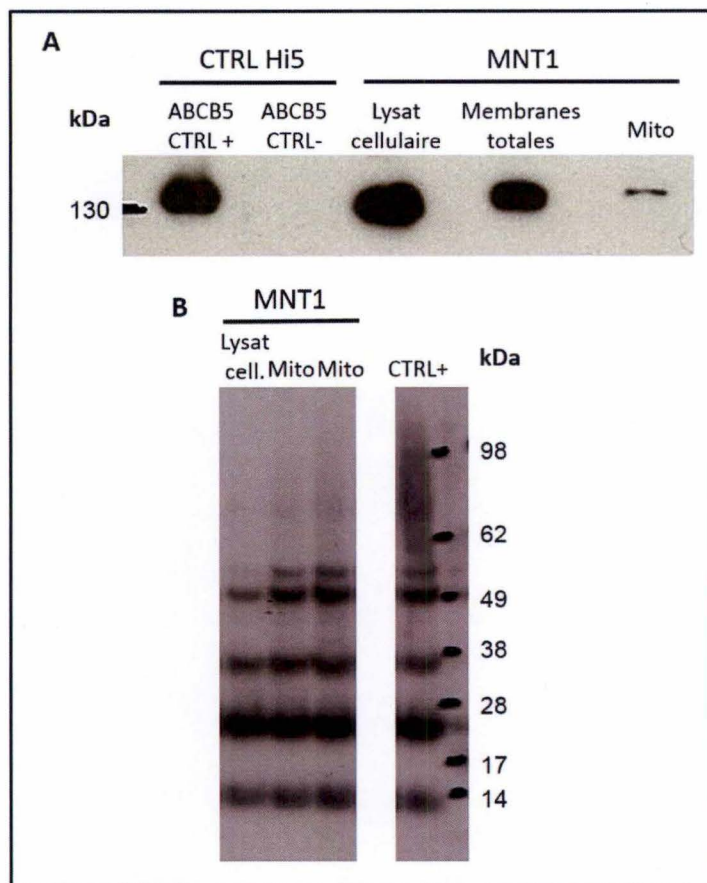


Figure 13 : A. Analyse par western blot de différents échantillons préparés à partir de cellules MNT1. Un lysat cellulaire (lysate cell.), des membranes totales et une fraction mitochondriale ont été préparés à partir de cellules MNT1, des cellules de mélanome hautement pigmentées. 50 µg de chaque échantillon ont été chargés et une bande à 138kDa est observée partout. Des contrôles, positif (CTRL+) et négatif (CTRL-), qui sont des membranes totales isolées à partir de cellules d'insectes transfectées ou non, de manière transitoire à l'aide de baculovirus possédant le gène codant pour ABCB5, ont également été chargés. Comme attendu, une bande à 138kDa n'est observable que pour le contrôle positif. **B. Evaluation par western blot de la présence et de l'intégrité des mitochondries isolées.** Un cocktail d'anticorps monoclonaux a été utilisé pour détecter le complexe Va (55kDa), le Core 1 du complexe III (49kDa), la porine humaine (39kDa), la cyclophiline D (21kDa) et le cytochrome c (12kDa). Le contrôle utilisé correspond à des mitochondries de cœur humain.

2.2 Fractionnement subcellulaire de cellules A375 WT et dosages enzymatiques

Afin de déterminer la localisation intracellulaire d'ABCB5 le plus précisément possible et de limiter les biais, nous avons choisi de travailler avec des cellules de mélanome non pigmentées, à savoir les cellules A375. En outre, ces cellules n'ont pas été manipulées génétiquement et expriment ABCB5 de façon constitutive.

Nous avons fractionné les cellules A375 par centrifugation différentielle (selon la procédure de Duve (141)). Cinq fractions ont été obtenues : N (nucléaire) ; M (mitochondriale lourde) ; L (mitochondriale légère) ; P (microsomale) et S (soluble).

En plus de la β -galactosidase et de l' α -glucosidase alcaline, enzymes marqueurs des lysosomes et du réticulum endoplasmique, les dosages de la phosphodiesterase alcaline, enzyme présente au niveau de la membrane plasmique, de la cytochrome oxydase, mitochondriale, et de la lactate déshydrogénase, localisée dans le cytosol, ont été réalisés. La **figure 14** présente les résultats de l'ensemble des dosages. Les résultats sont présentés sous forme de graphiques dont l'abscisse correspond au pourcentage de protéines contenu dans

chaque fraction, et l'ordonnée à l'activité spécifique relative (ASR = le pourcentage d'activité sur le pourcentage de protéines dans la fraction). La surface des rectangles formés apporte une troisième information qui est le pourcentage d'activité de l'enzyme dans chaque fraction.

En **A** figure le graphique obtenu pour la β -galactosidase (β -gal). On observe que l'enzyme est principalement détectée dans les fractions M, L et P (environ 90% de l'activité totale des cellules) bien qu'un enrichissement soit observé dans L, en considérant l'activité spécifique relative.

En ce qui concerne l' α -glucosidase alcaline (α -gluc) (**B**), elle est majoritairement présente dans la fraction P (41,66%) et un enrichissement de l'enzyme dans cette fraction est d'ailleurs observé. En effet, l'ASR est plus élevée dans P en comparaison aux autres fractions.

Tout comme l' α -glucosidase, la phosphodiesterase alcaline (PDase) (**C**) est présente de façon importante dans la fraction P. En effet, un peu plus de 67% de l'activité totale est retrouvé dans cette fraction. De plus, un enrichissement important est observé dans P.

Ces résultats indiquent que la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique présentent des profils de distribution similaires dans ces conditions de fractionnement.

Pour ce qui est de la cytochrome oxydase (cytox) (**D**), marqueur mitochondrial, un enrichissement est observé à la fois dans les fractions M et L, avec une ASR de 4,6 et 4,8 respectivement, bien que l'enzyme soit présente en plus grande quantité dans la fraction M (51% contre 25% dans la fraction L).

Enfin, le profil de la lactate déshydrogénase (LDH) (**E**), plutôt étalé, montre un faible enrichissement dans les fractions M et S (ASR de 0,95 et 1,41 respectivement) bien que l'on observe un pourcentage d'activité beaucoup plus important dans la fraction S (79%) qui indique que l'enzyme se trouve en majorité dans la fraction cytosolique.

En plus de ces cinq dosages, n'ayant pas d'enzyme marqueur pour le noyau, nous avons décidé de détecter un marqueur de cet organite (Histone H1) par western blot. Des quantités égales de protéines des cinq fractions et de la fraction E (=M+L+P+S) ont été chargées et un anticorps monoclonal anti-histone H1 a été utilisé. La **figure 14F** montre le résultat du western blot. On observe une bande à environ 37 kDa, pour les fractions N, très épaisse, M et P. Les signaux obtenus ont ensuite été quantifiés avec le programme ImageJ afin d'établir le profil de distribution des noyaux. La représentation graphique (**Fig. 14 G**) de cette distribution indique que, comme attendu, la vaste majorité des noyaux sédimente dans la fraction N.

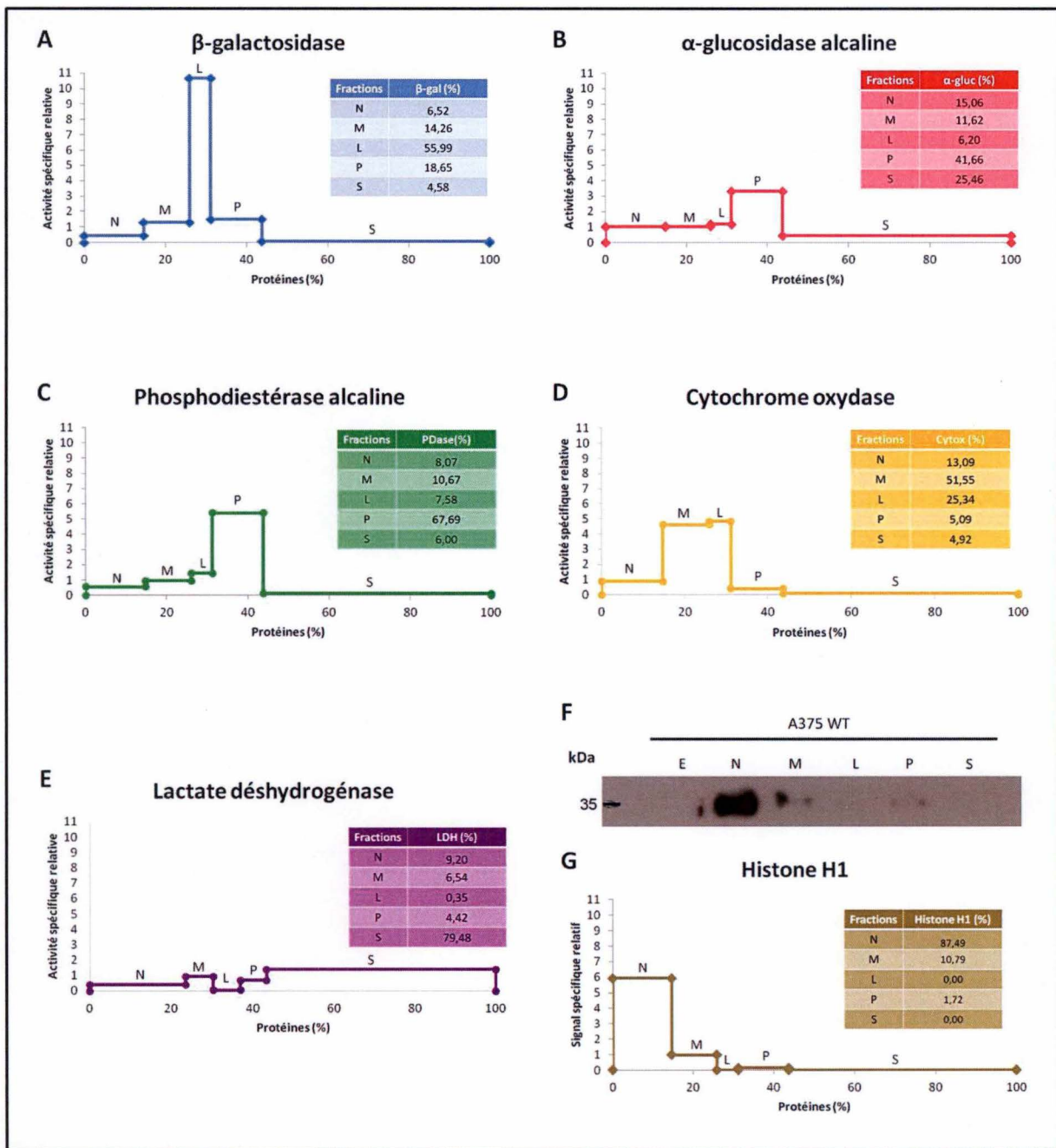


Figure 14 : Fractionnement subcellulaire de cellules A375 *wild-type* par centrifugation différentielle. L'activité de la β -galactosidase (β -gal) (A), enzyme marqueur des lysosomes, de l' α -glucosidase alcaline (α -gluc) (C), localisée dans le réticulum endoplasmique, de la phosphodiesterase alcaline (PDase) (C), située dans la membrane plasmique, de la cytochrome oxydase (Cytox) (D), mitochondriale et de la lactate déshydrogénase (LDH) (E), cytosolique, a été mesurée par tests fluorimétriques et par tests colorimétriques. Le pourcentage de protéines dans chaque fraction est représenté en abscisse (épaisseur des rectangles) et l'ordonnée correspond à l'activité spécifique relative (ASR) (hauteur des rectangles). L'ASR est le pourcentage d'activité de l'enzyme marqueur divisé par le pourcentage de protéines dans la fraction, et représente donc l'enrichissement de l'enzyme dans cette même fraction. La surface de chaque rectangle correspond au pourcentage d'activité de l'enzyme dans chaque fraction. Celui-ci est aussi repris dans les tableaux associés. En (F) est représenté le résultat d'un western blot pour lequel des quantités égales de protéines de chaque fraction (7 μ g) ont été chargées. L'anticorps primaire utilisé reconnaît la protéine histone H1, nucléaire, qui a une masse moléculaire de 37 kDa. Une bande est visible pour les fractions N, M et P. Les signaux de ce western blot ont également été quantifiés à l'aide du programme ImageJ et une représentation graphique du profil de distribution des noyaux (G) a été réalisée. Comme, dans ce cas, il ne s'agit plus d'une enzyme, on ne peut plus parler d'activité spécifique relative mais de signal spécifique relatif (ordonnée).

2.3 Western blot détectant la présence d'ABCB5 dans les fractions de cellules A375WT

Finalement, afin de pouvoir émettre une hypothèse quant à la localisation intracellulaire d'ABCB5, nous avons réalisé un western blot en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre ABCB5.

Nous avons chargé une quantité égale de protéines de chaque fraction obtenue après fractionnement des cellules A375WT. Deux contrôles ont également été utilisés, un positif (ABCB5 CTRL+) et un négatif (ABCB5 CTRL-) correspondant à des membranes totales de cellules d'insectes (cellules High Five) transfectées ou non de manière transitoire à l'aide de baculovirus possédant le gène codant pour ABCB5. Afin d'identifier ABCB5 dans nos échantillons, nous avons aussi chargé un échantillon de membranes totales extraites de cellules A375WT. Le résultat obtenu est présenté à la **figure 15A**. Comme attendu, une bande à environ 138 kDa est observée pour les deux contrôles positifs. En ce qui concerne les fractions, seules E, N, P et S présentent une bande à cette masse moléculaire. La **figure 15B** présente la quantification de ce western blot réalisée avec ImageJ représentée sous forme de graphique. Un enrichissement d'ABCB5 est observé à la fois dans les fractions N et P, bien qu'il soit environ deux fois plus important au niveau de N. La protéine est également présente en plus grande quantité au niveau de N (67,9%) par rapport à P (23,7%) et aux autres fractions.

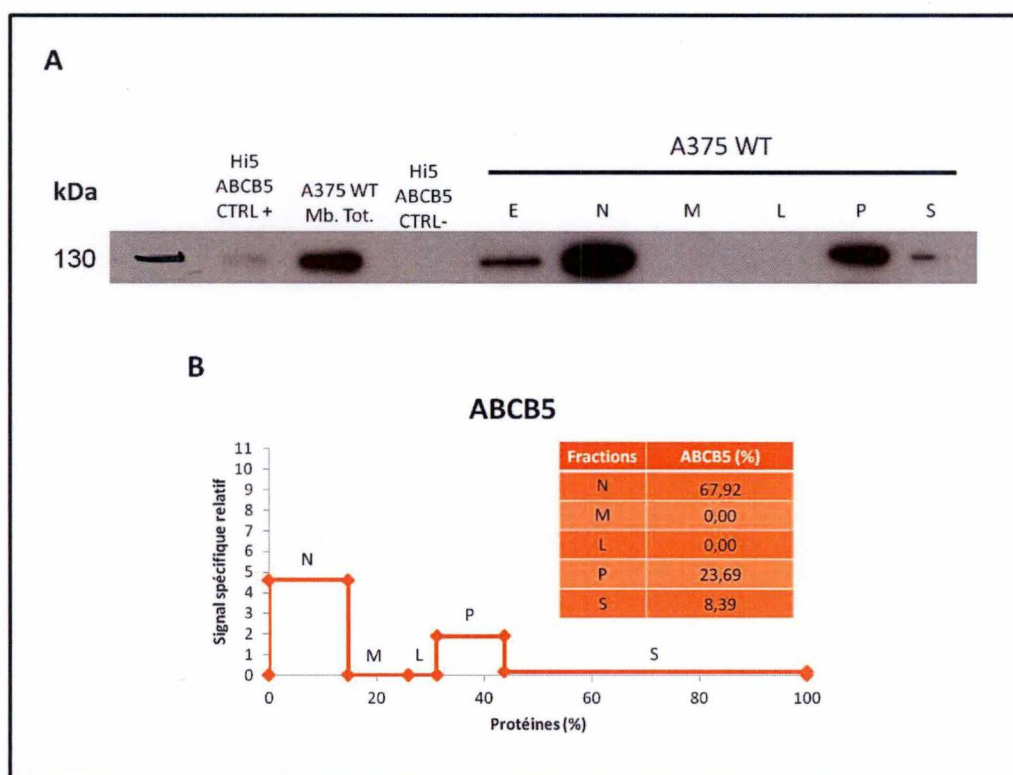


Figure 15 : Détection de la protéine ABCB5 par la technique de western blot et quantification. (A) Un western blot a été réalisé en utilisant un anticorps primaire polyclonal dirigé contre la protéine ABCB5. 7 µg de protéines de chaque fraction obtenue lors du fractionnement des cellules A375WT ont été chargés et trois contrôles ont été ajoutés. Deux contrôles, positif (ABCB5 CTRL+) et négatif (ABCB5 CTRL-), sont des membranes totales extraites de cellules d'insectes (cellules High Five) transfectées ou non de manière transitoire à l'aide de baculovirus possédant le gène codant pour ABCB5. Un échantillon de membranes totales extraites de cellules A375 WT a également été chargé (A375 WT Mb. Tot.). Une bande à 138 kDa est observée pour les deux contrôles positifs et pour les fractions E, N, P et S. (B) Le pourcentage de signal détecté pour chaque fraction a été déterminé à l'aide du programme ImageJ et rapporté par rapport au pourcentage de protéines présent dans ces mêmes fractions.

3. Rôle d'ABCB5 dans la cellule

3.1 Isolation de fibroblastes embryonnaires murins et mesure de l'activité β -galactosidase associée à la sénescence

Afin d'étudier le rôle d'ABCB5 dans la cellule, nous avons isolé des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) à partir d'embryons *knock-out* pour le gène *Abcb5* ou WT provenant d'une même portée. Après de nombreux essais, nous avons obtenu deux embryons KO et deux WT pour le gène *Abcb5*. Des MEFs ont été isolés à partir de chacun de ces embryons et mis en culture. La sénescence de ces cellules a été évaluée avant immortalisation, grâce à la mesure de l'activité de l'enzyme β -galactosidase, lysosomale, qui, en cas de sénescence, est détectée à pH 6. La **figure 16** présente le taux de sénescence obtenu pour les MEFs isolés à partir de chaque embryon. Globalement, il est inférieur à 1% bien que 1,2% de cellules sénescents aient été observées pour les MEFs provenant de l'embryon *wild-type* n°2.

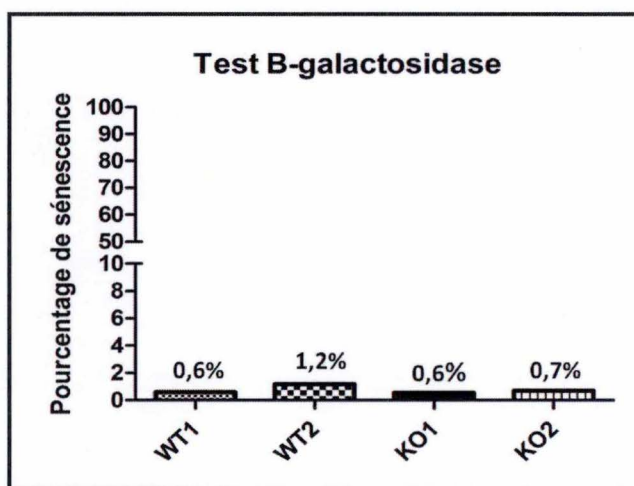


Figure 16 : Pourcentages de cellules sénescents au sein de MEFs évalués grâce à l'activité de l'enzyme β -galactosidase à pH 6. Des MEFs ont été isolés à partir de quatre embryons provenant d'une même portée, deux possédaient le gène *Abcb5* WT et deux possédaient le gène KO. Avant immortalisation, la sénescence des cellules a été évaluée grâce à un test β -galactosidase qui mène à la coloration des cellules sénescents en bleu. Après comptage des cellules, il s'est avéré que la sénescence était généralement inférieure à 1% sauf pour les MEFs de l'embryon WT2 pour lequel la sénescence s'élevait à 1,2%.

3.2 Evaluation de la survie des MEFs suite à leur exposition à une dose croissante de doxorubicine

Il a été récemment montré, *in vitro*, qu'ABCB5 joue un rôle dans la séquestration/l'efflux d'agents chimiothérapeutiques tels que les anthracyclines (135). Nous avons donc essayé de voir s'il y avait une quelconque différence entre les MEFs provenant d'embryons WT ou KO pour ce gène. Les cellules ont été exposées durant trois jours à 9 doses de doxorubicine comprises entre 3,9 et 1000 nM. La viabilité des cellules a ensuite été évaluée grâce à une mesure d'absorbance réalisée après mise en contact des cellules avec du CCK8. A partir de ces mesures, deux courbes de survie ont été tracées, une pour les MEFs provenant des embryons WT et une autre pour ceux provenant des embryons KO. Les résultats sont

présentés à la **figure 17** où l'on voit que les deux courbes se superposent. En effet, les concentrations efficaces médianes (CE50) des deux courbes sont très proches (31,72 nM (KO) et 26,74 nM (WT)) et un test statistique de Wilcoxon pour séries appariées a montré que la différence est non significative. On peut donc conclure qu'aucune différence n'est observée entre les MEFs provenant d'embryons WT et ceux provenant d'embryons KO en terme de réaction face à un agent chimiothérapeutique tel que la doxorubicine.

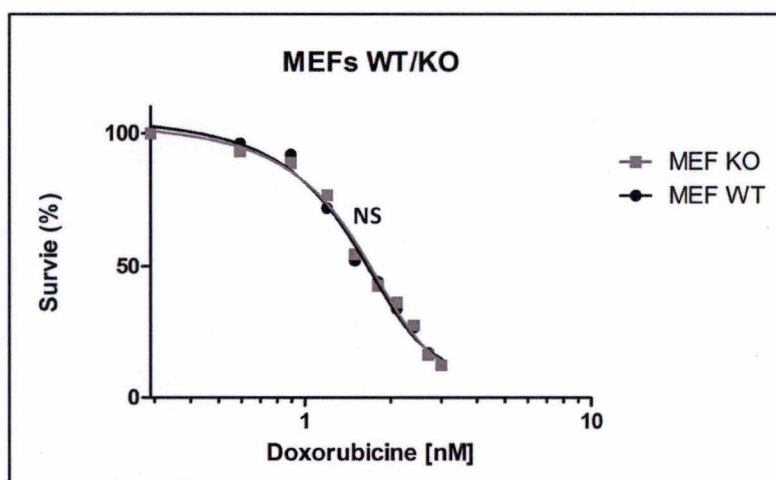


Figure 17 : Courbes de survie de fibroblastes embryonnaires murins provenant soit d'embryons présentant le gène *Abcb5* wild-type, soit KO pour ce gène, exposés à une dose croissante de doxorubicine. Des MEFs isolés à partir d'embryons WT ou KO ont été exposés durant trois jours à 9 doses de doxorubicine comprises entre 3,9 et 1000 nM. La viabilité des cellules a ensuite été évaluée avec du CCK-8 grâce à une mesure d'absorbance à 450 nm et une courbe a été tracée. La courbe grise représente les MEFs provenant d'embryons KO tandis que la noire correspond aux MEFs des embryons WT. La concentration efficace médiane (CE50) de ces deux courbes est de 31,72 et 26,74 respectivement. Un test statistique de Wilcoxon pour séries appariées a également été réalisé. La différence de sensibilité à la doxorubicine n'est pas statistiquement significative.

IV. Discussion et perspectives

1. Vérification *in vivo* du caractère suppresseur de tumeur d'*ABCB5*

Notre travail s'est basé sur un article, en révision pour publication, de Jean-Pierre Gillet et ses collègues (138). Ceux-ci ont séquencé l'exome d'*ABCB5* dans différents échantillons de mélanome humain et ont ainsi identifié des mutations récurrentes dans ce gène. Ils se sont particulièrement intéressés à quatre mutations (trois non-synonymes et une non-sens) associées à une diminution de l'activité du transporteur. De plus, lorsque le gène muté était inséré dans les cellules de mélanome (A375 ou SK-Mel28), celles-ci montraient une augmentation de leur prolifération, de leur invasion et de leur capacité de croissance indépendante d'un ancrage, en comparaison à des cellules exprimant le transporteur *wild-type*. Ces observations ont mené à l'hypothèse qu'*ABCB5* pourrait être un gène suppresseur de tumeur. De plus, cette étude a également montré que, dans 62,5% et 75% des échantillons présentant des mutations dans le gène *ABCB5*, ces mutations étaient associées à des mutations dans le gène *CDKN2A* et dans le gène *NRAS*, respectivement. Des mutations dans ces deux gènes sont par ailleurs couramment observées dans le cas du mélanome. En effet, une activation de *NRAS* est retrouvée dans environ 30% des mélanomes tandis que *CDKN2A* est délété dans 50% des cas (139, 142).

Une partie du travail de ce mémoire consistait à valider ces observations *in vivo* en générant trois souches murines. Sachant que le développement d'un mélanome nécessite l'activation d'un proto-oncogène et l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur, nous avons croisé des souris *knock-out* pour le gène *Abcb5*, ne développant pas de mélanome, créées par Jean-Pierre Gillet et ses collègues (données non publiées), avec deux autres souches de souris présentant soit un proto-oncogène muté, soit un gène suppresseur de tumeur délété.

À partir d'un modèle de Huijbers et ses collègues (139), TiRP-10B, qui développe des mélanomes, nous avons voulu générer deux souches distinctes. D'abord, une souris *knock-out* pour *Abcb5* présentant également une inactivation du gène suppresseur de tumeur *Cdkn2a*. Nous avons obtenu cette souche à trois mois de la fin de ce mémoire et avons pu traiter une souris au 4-hydroxytamoxifène à l'âge de sept semaines. Aucune tumeur n'a été observée à ce jour. Il est important de remarquer que, selon l'hypothèse, la souris présenterait deux gènes suppresseurs de tumeurs inactivés. Or, comme dit précédemment, l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur doit être complétée de l'activation d'un proto-oncogène pour permettre le développement d'un mélanome. Cependant, en 1997, Kenneth Kinzler et Bert Vogelstein (143) ont parlé de deux catégories de proto-oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs : les *gatekeepers* et les *caretakers*. Les gènes de la première catégorie coderaient pour des protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire tandis que les *caretakers* seraient impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome. Dès lors, il serait possible que la combinaison de mutations de deux gènes suppresseurs de tumeurs, *caretaker* et *gatekeeper*, induise le développement d'une tumeur (143, 144). Ainsi, il a été suggéré qu'*Abcb5* serait un *caretaker* alors que *Cdkn2a* est un *gatekeeper*. Une dernière chose importante à signaler est, qu'en 1996, une souris créée par Serrano et ses collègues (145), présentant uniquement une délétion du gène *Cdkn2a*, a développé spontanément des tumeurs,

principalement des fibrosarcomes et des lymphomes, mais qu'aucun cas de mélanome n'a pu être observé.

Ensuite, en utilisant à nouveau le modèle Tirp-10B, nous avons entrepris la génération d'une souris *knock-out* pour *Abcb5* et présentant une activation du proto-oncogène *HRas*. Il reste un croisement avant que la souche murine ne soit générée.

Dans la littérature, d'autres exemples de souris transgéniques présentant une activation de *HRas* ont été trouvés. En 1995, Powell et son équipe (146) ont généré des souris ayant uniquement l'activation de ce proto-oncogène. Celles-ci n'ont, à aucun moment, développé de mélanome mais une augmentation du nombre de mélanocytes et de la production de mélanine a été observée au niveau de la peau de ces animaux. D'autres équipes, telles que celle de Chin et Bardeesy (147, 148), ont travaillé sur la combinaison de cette activation au sein des mélanocytes avec l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur. Ils ont notamment couplé *HRas* avec une délétion de *Cdkn2a* et ont observé que les souris développaient spontanément des mélanomes cutanés. Ces tumeurs, bien que localement invasives, étaient non-métastatiques (148). Par la suite, la combinaison de *HRas* muté à une délétion du gène codant pour p53 a montré un même effet (147). Ainsi, étant donné qu'*Abcb5* serait également un gène suppresseur de tumeur, nous supposons que nos souris développeront également des mélanomes non-métastatiques.

La troisième et dernière souche murine que nous sommes en train de développer, est une souris *knock-out* pour le gène *Abcb5* et exprimant *NRas* activé. Elle a été générée à partir d'un modèle créé par Ackermann et ses collègues (140). Leurs souris présentent une activation de *NRas* au niveau des mélanocytes ainsi qu'une délétion du gène *Cdkn2a*. L'équipe a observé, chez ces animaux, un développement de mélanomes, autant au niveau du derme que de l'épiderme, ainsi que la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques à proximité de la tumeur primaire, mais également au niveau des poumons et du foie (140). Si notre hypothèse est correcte, nous pensons que nos souris devraient également développer des mélanomes qui contrairement à ceux de nos souris *HRas*, auraient un caractère métastatique.

2. Localisation intracellulaire d'ABCB5

En ce qui concerne la recherche de la localisation d'ABCB5 dans la cellule, nous avons utilisé deux approches. Dans un premier temps, nous avons émis l'hypothèse qu'ABCB5 est exprimé au niveau de la mitochondrie. Cette hypothèse a été émise sur base de résultats préliminaires obtenus au sein de notre laboratoire à partir de cellules de mélanome exprimant le gène de fusion ABCB5-eGFP. Nous avons isolé, à l'aide d'un kit, la fraction mitochondriale des cellules MNT1, qui, pour rappel, sont des cellules de mélanome hautement pigmentées. Une analyse en western blot nous a permis de détecter la présence d'ABCB5 dans la fraction mitochondriale. Cependant, ce résultat est à considérer avec prudence car nous n'avons pas évalué le niveau de pureté de la fraction isolée et il est très probable que notre échantillon soit contaminé par d'autres organites ou par des fragments de membranes plasmiques. De plus, il n'est pas représentatif de l'ensemble de la distribution d'ABCB5 dans la cellule. En effet, il se pourrait que la quantité de protéines ABCB5 détectées dans cette fraction mitochondriale ne corresponde qu'à un faible pourcentage de l'ensemble de ce transporteur présent dans la cellule au départ.

Notre deuxième approche consistait à fractionner des cellules de mélanome par centrifugation différentielle, à réaliser plusieurs dosages enzymatiques afin d'évaluer la distribution des organites dans chaque fraction obtenue et à finalement charger un échantillon de ces fractions en western blot pour détecter le transporteur ABCB5. Cette procédure est beaucoup plus fiable car, cette fois, on n'observe plus uniquement l'absence ou la présence d'ABCB5 dans une fraction indépendante mais bien sa distribution dans l'ensemble des fractions obtenues, donc dans l'ensemble de la cellule.

Un résultat important pour tenter de déterminer la localisation intracellulaire d'ABCB5 est le western blot présenté à la **figure 15** où la présence du transporteur, dans chaque fraction, a été évaluée. L'enrichissement ainsi que les pourcentages importants d'ABCB5 dans les fractions N et P indiquent que le transporteur serait localisé principalement dans ces fractions. On remarque également une faible quantité de transporteurs ABCB5 dans la fraction S (8,4%) contenant majoritairement du cytosol. Cependant, étant donné qu'ABCB5 n'est pas soluble, il semble peu plausible que cette protéine se retrouve dans cette fraction. L'hypothèse la plus probable est que ce pourcentage corresponde à de petites vésicules n'ayant pas sédimenté dans la fraction P (exosomes).

En ce qui concerne la fraction N, lorsque l'on regarde les graphiques correspondant aux dosages enzymatiques, on peut voir que la β -galactosidase, l' α -glucosidase alcaline, la phosphodiesterase alcaline, la cytochrome oxydase et la lactate déshydrogénase sont présentes en très faible quantité dans cette fraction (maximum 15% pour l' α -glucosidase alcaline). Donc, celle-ci contient très peu de lysosomes, de réticulum endoplasmique, de morceaux de membranes plasmiques, de mitochondries et de parties de cytosols. En revanche, lorsqu'on considère la quantification du western blot détectant l'histone H1, on remarque que cette protéine du nucléoplasme est fortement représentée dans la fraction N, ce qui indique que la majorité des noyaux s'y trouve. Pour ce qui est de la fraction P, un enrichissement et une présence importante des enzymes α -glucosidase alcaline et phosphodiesterase alcaline y ont été observés. Cela suggère que des réticulum endoplasmique et des morceaux de membranes plasmiques se trouvent en quantité importante dans cette fraction en comparaison avec les autres organites pour lesquels nous avons effectué un dosage enzymatique, bien que ceux-ci soient aussi présents mais représentent un très faible pourcentage (maximum 18% pour la β -galactosidase, donc pour les lysosomes). Il est important de remarquer que nous n'avons pas dosé d'enzyme marqueur de l'appareil de Golgi. En théorie, cet organite devrait également se retrouver dans la fraction P. Des endosomes pourraient aussi s'y trouver.

Sur base de toutes ces observations, nous pouvons conclure qu'ABCB5 ne se trouve pas dans la mitochondrie, ce qui contredit nos résultats préliminaires obtenus par imagerie confocale à partir de cellules de mélanome transfectées avec un vecteur codant pour une protéine de fusion ABCB5-eGFP. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas suffisants pour déduire la localisation exacte du transporteur mais ils nous fournissent de nouvelles pistes à investiguer. En effet, notre recherche pourra désormais s'orienter vers le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique et les endosomes. Il faut aussi

remarquer que le profil obtenu (N+P) pourrait signifier qu'ABCB5 présente une localisation mixte bien qu'il se pourrait également que ce profil corresponde à la distribution d'une autre enzyme marqueur dont nous n'avons pas dosé l'activité.

ABCB5 est structurellement proche d'ABCB1, certainement l'ABC transporteur le plus caractérisé. Il y a 73% d'homologie de séquence d'acides aminés entre ces deux transporteurs (137). Selon la littérature, ABCB1 a été localisé dans les organites mentionnés ci-avant ainsi que dans la membrane plasmique. Il serait d'ailleurs principalement localisé dans cette-dernière. En effet, en 1987, Willingham et son équipe (149) ont réalisé une immunocytochimie à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre ABCB1, sur des cellules humaines de carcinome (KB-C4), qu'ils ont observées au microscope électronique à transmission. Les images montrent une distribution majoritaire d'ABCB1 dans la membrane plasmique, bien qu'une faible présence du transporteur dans la lumière des saccules de l'appareil de Golgi et une trace dans le réticulum endoplasmique aient été observées (149). En ce qui concerne le rôle du transporteur au niveau de cette membrane, on sait, par exemple, qu'au niveau du foie, étant retrouvé du côté apical des hépatocytes bordant les canalicules biliaires, il transporte des xénobiotiques et des métabolites dans la bile (150, 151). De même, sa localisation au niveau de la barrière hémato-encéphalique empêcherait le passage, au niveau du cerveau, de xénobiotiques (150–152). Cependant, comme dit précédemment, dans le cas d'un cancer, ABCB1 est un acteur majeur de la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques. Pour rappel, l'article de Ueda, publié en 1986 (114), montrait que l'expression d'un ADNc correspondant au gène *ABCB1* au sein de cellules 3T3 ou KB les rendait résistantes à la doxorubicine, notamment.

En 2000, par exemple, ABCB1 a été retrouvé dans l'enveloppe nucléaire de cellules humaines de cancer du sein, MCF-7, multirésistantes aux médicaments (153). Ces mêmes cellules, traitées avec de la doxorubicine, agent intercalant inhibiteur de la topoisomérase II qui est une enzyme impliquée notamment dans la réplication et la transcription de l'ADN en agissant sur la structure de cette molécule (154), présentaient une accumulation du médicament dans le cytoplasme et non dans le noyau. Des cellules MCF-7 WT ont été traitées également et, dans leur cas, la doxorubicine se trouvait dans le noyau (153). Une autre étude, réalisée par Szaflarski en 2013 (154), a montré qu'ABCB1 était également localisé dans l'enveloppe nucléaire de cellules LoVo, cellules humaines de carcinome du côlon. De plus, ils ont également observé que, pour des cellules LoVo résistantes à la doxorubicine, cet agent chimiothérapeutique se localisait à la fois dans le cytoplasme et le noyau, contrairement aux cellules LoVo WT pour lesquelles la doxorubicine était uniquement retrouvée dans le noyau. Ces observations vont dans le sens d'un efflux des agents cytotoxiques hors du noyau par ABCB1 (153, 154). En outre, Calcabrini et ses collègues, mentionnent que la doxorubicine se trouvant dans le cytoplasme semble se concentrer dans une zone périnucléaire qui pourrait bien être attribuée à l'appareil de Golgi (153). Cette affirmation n'est pas surprenante étant donné qu'ABCB1 a déjà été localisé dans cet organite. En effet, Willingham en parle dans son article de 1987 (149) et, de plus, en 1994 et 1998, deux articles écrits par Molinari et ses collègues (155, 156) rapportaient qu'ABCB1 était présent dans l'appareil de Golgi de cellules MCF-7 multirésistantes et de cellules humaines de mélanome. L'article de 1998, mentionne aussi une accumulation de doxorubicine dans cet organite et les auteurs ont suggéré que

l'appareil de Golgi pourrait constituer un intermédiaire dans le transport de ce médicament du noyau, dont il a été expulsé, vers la membrane plasmique (155).

En 2004, Fu et son équipe (157) ont étudié le parcours dans la cellule d'une protéine ABCB1 couplée à une protéine fluorescente EGFP nouvellement synthétisée, en transfectant des cellules HeLa avec un plasmide contenant la construction codant pour cette protéine de fusion. Ils ont observé qu'après 12 à 15 heures post-transfection, la synthèse de la protéine débute dans le réticulum endoplasmique. Ensuite, après 18 heures, la protéine est transférée à l'appareil de Golgi où elle subit des modifications post-traductionnelles avant d'être envoyée vers la membrane plasmique. Finalement, entre 22 et 48 heures après transfection, la protéine se trouve en membrane mais elle est également toujours présente dans l'appareil de Golgi. Il ressort de ces observations qu'ABCB1 est présent de manière transitoire dans le réticulum endoplasmique, uniquement lors de sa synthèse. Par contre, sa présence prolongée dans l'appareil de Golgi pourrait constituer une réserve afin de maintenir le nombre de transporteurs ABCB1 en membrane plasmique (151, 157).

Un dernier détail à traiter est le transport d'ABCB1 du Golgi vers la membrane plasmique, celui-ci se ferait via le système endosomal (158).

Ce parallélisme avec ABCB1 démontre qu'une localisation dans la membrane plasmique, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, le noyau et les endosomes est possible pour les transporteurs ABC. Cependant, bien qu'ABCB1 semble avoir une distribution ubiquitaire dans la cellule, nous ne pouvons pas affirmer que c'est également le cas pour ABCB5.

Nos résultats obtenus doivent être validés sur d'autres lignées cellulaires et par imagerie confocale à l'aide d'anticorps monoclonaux. Ces anticorps, développés par un collaborateur, sont en cours d'évaluation au sein de notre laboratoire. En outre, lorsque nous additionnons les signaux correspondant à ABCB5 obtenus dans les fractions M, L, P et S, nous ne retrouvons qu'environ 70% du signal qui était présent dans l'extrait E (dont les autres fractions sont issues). Ceci suggère que le résultat du western blot est moins précis qu'une mesure par dosages enzymatiques pour lesquels les pourcentages de récupération sont plus proches de 80 à 100%. Ceci rend l'interprétation de ce résultat moins fiable. Ce western blot sera toutefois répété en utilisant cette fois l'anticorps monoclonal qui sera préalablement validé. Nous pourrions également compléter notre analyse par les dosages d'enzymes marqueurs pour l'appareil de Golgi et les peroxysomes (comportement normalement identique aux lysosomes), et par le dosage d'une autre enzyme du réticulum endoplasmique qui, cette fois, serait membranaire. Enfin, si la localisation d'ABCB5 dans les fractions N est P est confirmée, il faudra réaliser un sous-fractionnement de ces fractions en centrifugeant chacune d'elles dans un gradient de saccharose afin d'obtenir des sous-fractions enrichies en différents organites distincts.

3. Rôle d'ABCB5 dans la cellule

Afin d'étudier le rôle d'ABCB5 dans la cellule, nous avons isolé des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) à partir d'embryons de souris WT ou KO pour le gène *Abcb5*. Nous avons quatre embryons au départ provenant d'une même portée, deux WT et deux KO, nous avons donc finalement isolé quatre populations différentes de MEFs. Après immortalisation, nous avons enfin obtenu des cellules utilisables pour l'étude du rôle d'ABCB5 dans la cellule. Cependant, ces quelques étapes ont pris énormément de temps dans la mesure où nous avons eu beaucoup de difficultés à obtenir des embryons KO et WT provenant d'une même portée.

À ce jour, nous avons pu comparer la réaction des MEFs provenant d'embryons WT à ceux provenant d'embryons KO suite à l'exposition de ceux-ci à une dose croissante de doxorubicine. Nous avons tracé une courbe de dose pour chaque type de MEFs et la **figure 17** montre une superposition des deux courbes ainsi que des concentrations efficaces médianes très proches. Un test statistique de Wilcoxon pour séries appariées a montré que la différence est non significative. Dans un article de 2012 (135), Kawanobe et ses collègues avaient transfecté des cellules HEK293 avec un ADNc correspondant à ABCB5 et évalué leur sensibilité à différents agents chimiothérapeutiques en comparaison à des HEK293 WT. Ils avaient notamment testé la doxorubicine et avaient observé une résistance 1,5 fois plus importante chez les cellules transfectées, ce qui correspond à une différence mineure. Par contre, la résistance augmentait à 2,3 et 3 pour le paclitaxel et le docétaxel respectivement. Le fait que nous n'observons pas de différence entre nos deux types de MEFs vient peut-être du fait que le gène *Abcb5* est délété et non surexprimé dans notre cas. Ainsi, le niveau basal d'expression d'*Abcb5* est peut-être très faible et il existe, dès lors, une différence infime entre nos cellules KO et WT. Des tests de cytotoxicité au paclitaxel et au docétaxel seront réalisés.

V. Conclusion

En conclusion, le travail réalisé durant ces dix mois a d'abord permis la génération de trois souches murines présentant toutes une délétion du gène *Abcb5* et une inactivation d'un gène suppresseur de tumeur (*Cdkn2a*) ou l'activation d'un proto-oncogène (*NRas* ou *HRas*) ou afin d'étudier le caractère suppresseur de tumeur d'ABCB5. À ce jour, seule la souche *Abcb5-Cdkn2a* a été obtenue et aucun développement de tumeurs n'a été observé.

Ensuite, afin d'étudier la localisation intracellulaire d'ABCB5, des cellules de mélanomes ont été fractionnées par centrifugation différentielle. Et, suite à des dosages enzymatiques et des western blots, il s'avère qu'ABCB5 ne se trouve pas dans les mitochondries mais semble être plutôt au niveau du noyau, du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, de la membrane plasmique et des endosomes (Fractions N et P). Nous devons cependant valider nos résultats à l'aide d'anticorps monoclonaux. Par la suite, nous réaliserons également une immunofluorescence à l'aide de ces mêmes anticorps.

Afin de compléter notre analyse, il serait également utile de doser d'autres enzymes marqueurs présentes dans l'appareil de Golgi, les peroxysomes et la membrane du réticulum endoplasmique.

Si après toutes ces nouvelles expériences, la localisation d'ABCB5 est confirmée dans les fractions N et P, il faudra sous-fractionner chacune de celles-ci afin d'obtenir des sous-fractions enrichies en différents organites distincts.

Enfin, des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) ont été isolés à partir d'embryons présentant une délétion pour le gène *Abcb5* ou non et ont été immortalisés. ;À ce jour, seul un test de sensibilité à la doxorubicine a été réalisé et il s'avère qu'aucune différence n'a été observée entre les MEFs KO et WT. Cependant, pour confirmation, il faudra réaliser le même test mais avec du paclitaxel et du docétaxel.

Pour la poursuite de ce travail de recherche, il sera primordial de déterminer la localisation subcellulaire exacte d'ABCB5 avant d'utiliser les MEFs pour valider ou non les diverses hypothèses qui seront émises sur le rôle physiologique potentiel du transporteur ABCB5.

Bibliographie

1. L. P. Gartner, J. L. Hiatt, *Atlas en couleur d'histologie - 3e édition française* (Reuil-Malmaison, Editions P., 2012), pp. 229–233.
2. M. Pons, M. Quintanilla, Molecular biology of malignant melanoma and other cutaneous tumors., *Clin. Transl. Oncol.* **8**, 466–74 (2006).
3. Epidermal Layer (2011) (available at <http://dmnemonics.blogspot.be/2011/12/epidermal-layer.html>).
4. American Cancer Society - What are basal and squamous cell skin cancers? (available at <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-basalandsquamouscell/detailedguide/skin-cancer-basal-and-squamous-cell-what-is-basal-and-squamous-cell>).
5. J. A. Neville, E. Welch, D. J. Leffell, Management of nonmelanoma skin cancer in 2007., *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 462–9 (2007).
6. M. Chartrain, thesis, Université Toulouse III (2011).
7. V. Madan, J. T. Lear, R.-M. Szeimies, Non-melanoma skin cancer., *Lancet* **375**, 673–85 (2010).
8. B. K. Armstrong, A. Krickler, The epidemiology of UV induced skin cancer., *J. Photochem. Photobiol. B.* **63**, 8–18 (2001).
9. V. Gray-Schopfer, C. Wellbrock, R. Marais, Melanoma biology and new targeted therapy., *Nature* **445**, 851–7 (2007).
10. J. Ferlay *et al.*, Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012., *Eur. J. Cancer* **49**, 1374–403 (2013).
11. B. Bandarchi, C. A. Jabbari, A. Vedadi, R. Navab, Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells., *J. Clin. Pathol.* **66**, 644–8 (2013).
12. K. B. Larsson, H. M. Shaw, J. F. Thompson, R. C. Harman, W. H. McCarthy, Primary mucosal and glans penis melanomas: the Sydney Melanoma Unit experience., *Aust. N. Z. J. Surg.* **69**, 121–6 (1999).
13. M. Pandey, A. Mathew, E. K. Abraham, I. M. Ahamed, K. M. Nair, Primary malignant melanoma of the mucous membranes., *Eur. J. Surg. Oncol.* **24**, 303–7 (1998).
14. Y. Yamaguchi, M. Brenner, V. J. Hearing, The regulation of skin pigmentation., *J. Biol. Chem.* **282**, 27557–61 (2007).
15. M. R. Hussein, Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms., *J. Cutan. Pathol.* **32**, 191–205 (2005).

16. J. Y. Lin, D. E. Fisher, Melanocyte biology and skin pigmentation., *Nature* **445**, 843–50 (2007).
17. M. Seiji, K. Shimao, M. S. Birbeck, T. B. Fitzpatrick, Subcellular localization of melanin biosynthesis., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **100**, 497–533 (1963).
18. C. Wasmeier, A. N. Hume, G. Bolasco, M. C. Seabra, Melanosomes at a glance., *J. Cell Sci.* **121**, 3995–9 (2008).
19. V. Bhatnagar, S. Anjaiah, N. Puri, B. N. Darshanam, A. Ramaiah, pH of melanosomes of B 16 murine melanoma is acidic: its physiological importance in the regulation of melanin biosynthesis., *Arch. Biochem. Biophys.* **307**, 183–92 (1993).
20. I. C. Le Poole *et al.*, Phagocytosis by normal human melanocytes in vitro., *Exp. Cell Res.* **205**, 388–95 (1993).
21. S. Diment, M. Eidelman, G. M. Rodriguez, S. J. Orlow, Lysosomal hydrolases are present in melanosomes and are elevated in melanizing cells., *J. Biol. Chem.* **270**, 4213–5 (1995).
22. B. K. Zhou, R. E. Boissy, S. Pifko-Hirst, D. J. Moran, S. J. Orlow, Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) is the melanocyte vesicular membrane glycoprotein band II., *J. Invest. Dermatol.* **100**, 110–4 (1993).
23. E. C. Dell’Angelica, C. Mullins, S. Caplan, J. S. Bonifacio, Lysosome-related organelles., *FASEB J.* **14**, 1265–78 (2000).
24. B. K. Zhou *et al.*, Identification of a melanosomal matrix protein encoded by the murine si (silver) locus using “organelle scanning”., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 7076–80 (1994).
25. G. Raposo, M. S. Marks, Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 786–97 (2007).
26. X. Wu, B. Bowers, K. Rao, Q. Wei, Hammer JA, Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function In vivo., *J. Cell Biol.* **143**, 1899–918 (1998).
27. K. Van Den Bossche, J.-M. Naeyaert, J. Lambert, The quest for the mechanism of melanin transfer., *Traffic* **7**, 769–78 (2006).
28. M. S. Marks, M. C. Seabra, The melanosome: membrane dynamics in black and white., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 738–48 (2001).
29. E. R. Sharlow *et al.*, The protease-activated receptor-2 upregulates keratinocyte phagocytosis., *J. Cell Sci.* **113** (Pt 1, 3093–101 (2000).
30. A. Hennessy *et al.*, Eumelanin and pheomelanin concentrations in human epidermis before and after UVB irradiation., *Pigment Cell Res.* **18**, 220–3 (2005).
31. K. Wakamatsu *et al.*, Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin., *Pigment Cell Res.* **19**, 154–62 (2006).

32. Y. Liu *et al.*, Comparison of structural and chemical properties of black and red human hair melanosomes., *Photochem. Photobiol.* **81**, 135–44 (2005).
33. T. Hirobe, Role of keratinocyte-derived factors involved in regulating the proliferation and differentiation of mammalian epidermal melanocytes., *Pigment Cell Res.* **18**, 2–12 (2005).
34. S. Im *et al.*, Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation., *Cancer Res.* **58**, 47–54 (1998).
35. I. Suzuki *et al.*, Agouti signaling protein inhibits melanogenesis and the response of human melanocytes to alpha-melanotropin., *J. Invest. Dermatol.* **108**, 838–42 (1997).
36. A. J. Miller, M. C. Mihm, Melanoma., *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
37. D. L. Cummins *et al.*, Cutaneous malignant melanoma., *Mayo Clin. Proc.* **81**, 500–7 (2006).
38. S. D. Walter, W. D. King, L. D. Marrett, Association of cutaneous malignant melanoma with intermittent exposure to ultraviolet radiation: results of a case-control study in Ontario, Canada., *Int. J. Epidemiol.* **28**, 418–27 (1999).
39. P. Autier, J. F. Doré, Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer., *Int. J. Cancer* **77**, 533–7 (1998).
40. T. B. Fitzpatrick, Sun and skin, *J. Médecine Esthétique* , 33–34 (1975).
41. M. R. Zaidi, C.-P. Day, G. Merlino, From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse., *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2381–91 (2008).
42. V. Beral, S. Evans, H. Shaw, G. Milton, Cutaneous factors related to the risk of malignant melanoma., *Br. J. Dermatol.* **109**, 165–72 (1983).
43. C. M. Olsen, H. J. Carroll, D. C. Whiteman, Estimating the attributable fraction for melanoma: a meta-analysis of pigmentary characteristics and freckling., *Int. J. Cancer* **127**, 2430–45 (2010).
44. C. Garbe *et al.*, Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society., *J. Invest. Dermatol.* **102**, 695–9 (1994).
45. B. C. Bastian, The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia., *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 239–71 (2014).
46. T. Regad, Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression., *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 4055–65 (2013).
47. A. A. Nelson, H. Tsao, Melanoma and genetics., *Clin. Dermatol.* **27**, 46–52 (2009).

48. D. E. Quelle, F. Zindy, R. A. Ashmun, C. J. Sherr, Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest., *Cell* **83**, 993–1000 (1995).
49. V. C. Gray-Schopfer *et al.*, Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?, *Br. J. Cancer* **95**, 496–505 (2006).
50. E. Sharpless, L. Chin, The INK4a/ARF locus and melanoma., *Oncogene* **22**, 3092–8 (2003).
51. L. Chin, The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man., *Nat. Rev. Cancer* **3**, 559–70 (2003).
52. M. Serrano, G. J. Hannon, D. Beach, A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4., *Nature* **366**, 704–7 (1993).
53. J. Pomerantz *et al.*, The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53., *Cell* **92**, 713–23 (1998).
54. K. Satyamoorthy, M. Herlyn, Cellular and molecular biology of human melanoma., *Cancer Biol. Ther.* **1**, 14–7 (2002).
55. L. Zuo *et al.*, Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma., *Nat. Genet.* **12**, 97–9 (1996).
56. H. Davies *et al.*, Mutations of the BRAF gene in human cancer., *Nature* **417**, 949–54 (2002).
57. L. Chin, L. A. Garraway, D. E. Fisher, Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era., *Genes Dev.* **20**, 2149–82 (2006).
58. V. K. Goel, A. J. F. Lazar, C. L. Warneke, M. S. Redston, F. G. Haluska, Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma., *J. Invest. Dermatol.* **126**, 154–60 (2006).
59. V. Stambolic *et al.*, Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN., *Cell* **95**, 29–39 (1998).
60. D. Chantal, E. Raymond, S. Faivre, La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, *Cancéro Dig.* **1**, 187–189 (2009).
61. T. Daikoku, S. K. Dey, Two faces of PTEN., *Nat. Med.* **14**, 1192–3 (2008).
62. W. H. Clark *et al.*, A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma., *Hum. Pathol.* **15**, 1147–65 (1984).
63. D. E. Elder, Thin melanoma., *Arch. Pathol. Lab. Med.* **135**, 342–6 (2011).
64. A. Breslow, Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma., *Ann. Surg.* **172**, 902–8 (1970).

65. D. L. Morton, D. G. Davtyan, L. A. Wanek, L. J. Foshag, A. J. Cochran, Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness., *Cancer* **71**, 3737–43 (1993).
66. C. M. Balch *et al.*, Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma., *J. Clin. Oncol.* **19**, 3635–48 (2001).
67. A. M. M. Eggermont, A. Spatz, C. Robert, Cutaneous melanoma., *Lancet* **383**, 816–27 (2014).
68. A. Barth, L. A. Wanek, D. L. Morton, Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases., *J. Am. Coll. Surg.* **181**, 193–201 (1995).
69. S. Bhatia, S. S. Tykodi, J. A. Thompson, Treatment of metastatic melanoma: an overview., *Oncology (Williston Park)*. **23**, 488–96 (2009).
70. J. Manola, M. Atkins, J. Ibrahim, J. Kirkwood, Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials., *J. Clin. Oncol.* **18**, 3782–93 (2000).
71. A. A. Tarhini, S. S. Agarwala, Cutaneous melanoma: available therapy for metastatic disease., *Dermatol. Ther.* **19**, 19–25 (2006).
72. P. Anderson, D. Aguilera, M. Pearson, S. Woo, Outpatient chemotherapy plus radiotherapy in sarcomas: improving cancer control with radiosensitizing agents., *Cancer Control* **15**, 38–46 (2008).
73. M. Sanada, Y. Takagi, R. Ito, M. Sekiguchi, Killing and mutagenic actions of dacarbazine, a chemotherapeutic alkylating agent, on human and mouse cells: effects of Mgmt and Mlh1 mutations., *DNA Repair (Amst)*. **3**, 413–20 (2004).
74. R. Bei, L. Marzocchella, M. Turriziani, The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: clinical evidence and molecular mechanisms of action., *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **5**, 172–87 (2010).
75. P. Lui *et al.*, Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials., *Cancer Treat. Rev.* **33**, 665–80 (2007).
76. S. M. Lee, D. C. Betticher, N. Thatcher, Melanoma: chemotherapy., *Br. Med. Bull.* **51**, 609–30 (1995).
77. M. S. Soengas, S. W. Lowe, Apoptosis and melanoma chemoresistance., *Oncogene* **22**, 3138–51 (2003).
78. S. Pestka, A dance between interferon-alpha/beta and p53 demonstrates collaborations in tumor suppression and antiviral activities., *Cancer Cell* **4**, 85–7 (2003).
79. E. T. Creagan *et al.*, Phase II trials of recombinant leukocyte A interferon in disseminated malignant melanoma: results in 96 patients., *Cancer Treat. Rep.* **70**, 619–24 (1986).

80. K. Wheatley *et al.*, Does adjuvant interferon-alpha for high-risk melanoma provide a worthwhile benefit? A meta-analysis of the randomised trials., *Cancer Treat. Rev.* **29**, 241–52 (2003).
81. M. B. Atkins, L. Kunkel, M. Sznol, S. A. Rosenberg, High-dose recombinant interleukin-2 therapy in patients with metastatic melanoma: long-term survival update., *Cancer J. Sci. Am.* **6 Suppl 1**, S11–4 (2000).
82. L. Fong, E. J. Small, Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment., *J. Clin. Oncol.* **26**, 5275–83 (2008).
83. S. G. Downey *et al.*, Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by CTL-associated antigen-4 blockade., *Clin. Cancer Res.* **13**, 6681–8 (2007).
84. C. Robert *et al.*, Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma., *N. Engl. J. Med.* **364**, 2517–26 (2011).
85. G. Bollag *et al.*, Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma., *Nature* **467**, 596–9 (2010).
86. E. J. Jordan, C. M. Kelly, Vemurafenib for the treatment of melanoma., *Expert Opin. Pharmacother.* **13**, 2533–43 (2012).
87. P. B. Chapman *et al.*, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation., *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–16 (2011).
88. H. Shi *et al.*, Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance., *Nat. Commun.* **3**, 724 (2012).
89. L. Zimmer *et al.*, Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition., *J. Clin. Oncol.* **30**, 2375–83 (2012).
90. J.-P. Gillet, M. M. Gottesman, Mechanisms of multidrug resistance in cancer., *Methods Mol. Biol.* **596**, 47–76 (2010).
91. M. F. Ullah, Cancer multidrug resistance (MDR): a major impediment to effective chemotherapy., *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **9**, 1–6 (2008).
92. J.-P. Gillet, T. Efferth, J. Remacle, Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes., *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 237–62 (2007).
93. M. Dean, Y. Hamon, G. Chimini, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily., *J. Lipid Res.* **42**, 1007–17 (2001).
94. V. Vasiliou, K. Vasiliou, D. W. Nebert, Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family., *Hum. Genomics* **3**, 281–90 (2009).

95. K. J. Linton, C. F. Higgins, The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins., *Mol. Microbiol.* **28**, 5–13 (1998).
96. A. Goffeau *et al.*, Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily., *Yeast* **13**, 43–54 (1997).
97. T. Efferth, The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside., *Curr. Mol. Med.* **1**, 45–65 (2001).
98. K. J. Linton, Structure and function of ABC transporters., *Physiology (Bethesda)*. **22**, 122–30 (2007).
99. E. Biemans-Oldehinkel, M. K. Doeven, B. Poolman, ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains., *FEBS Lett.* **580**, 1023–35 (2006).
100. D. C. Rees, E. Johnson, O. Lewinson, ABC transporters: the power to change., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 218–27 (2009).
101. R. M. Story, T. A. Steitz, Structure of the recA protein-ADP complex., *Nature* **355**, 374–6 (1992).
102. L. W. Hung *et al.*, Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter., *Nature* **396**, 703–7 (1998).
103. A. L. Davidson, E. Dassa, C. Orelle, J. Chen, Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 317–64, table of contents (2008).
104. J. E. Walker, M. Saraste, M. J. Runswick, N. J. Gay, Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold., *EMBO J.* **1**, 945–51 (1982).
105. P. M. Jones, A. M. George, Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simulation of a well characterized nucleotide-binding subunit., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 12639–44 (2002).
106. P. M. Jones, A. M. George, Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture., *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 187–202 (1999).
107. J. Chen, G. Lu, J. Lin, A. L. Davidson, F. A. Quiocho, A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle., *Mol. Cell* **12**, 651–61 (2003).
108. A. L. Davidson, J. Chen, ATP-binding cassette transporters in bacteria., *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 241–68 (2004).
109. C. F. Higgins, K. J. Linton, The ATP switch model for ABC transporters., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 918–26 (2004).

110. Z. E. Sauna, S. V Ambudkar, Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes., *J. Biol. Chem.* **276**, 11653–61 (2001).
111. S. V Ambudkar, I.-W. Kim, Z. E. Sauna, The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1)., *Eur. J. Pharm. Sci.* **27**, 392–400 (2006).
112. R. L. Juliano, V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants., *Biochim. Biophys. Acta* **455**, 152–62 (1976).
113. Z. E. Sauna, S. V Ambudkar, About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work., *Mol. Cancer Ther.* **6**, 13–23 (2007).
114. K. Ueda, C. Cardarelli, M. M. Gottesman, I. Pastan, Expression of a full-length cDNA for the human “MDR1” gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3004–8 (1987).
115. M. M. Gottesman, T. Fojo, S. E. Bates, Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters., *Nat. Rev. Cancer* **2**, 48–58 (2002).
116. K. Murphy, *Janeway's Immunobiology* (Garland Science, New York, 2012).
117. R. P. J. Oude Elferink, C. C. Paulusma, Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein)., *Pflügers Arch.* **453**, 601–10 (2007).
118. S. Langheim *et al.*, ABCG5 and ABCG8 require MDR2 for secretion of cholesterol into bile., *J. Lipid Res.* **46**, 1732–8 (2005).
119. T. Gerloff *et al.*, The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver., *J. Biol. Chem.* **273**, 10046–50 (1998).
120. P. C. Krishnamurthy *et al.*, Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter., *Nature* **443**, 586–9 (2006).
121. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger-Principles of biochemistry* (W. H. Freeman and Company, New York, Fifth edit., 2008).
122. M. Liesa, W. Qiu, O. S. Shirihai, Mitochondrial ABC transporters function: the role of ABCB10 (ABC-me) as a novel player in cellular handling of reactive oxygen species., *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1945–57 (2012).
123. G. Kispal, P. Csere, C. Prohl, R. Lill, The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins., *EMBO J.* **18**, 3981–9 (1999).
124. S. Taketani, K. Kakimoto, H. Ueta, R. Masaki, T. Furukawa, Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase., *Blood* **101**, 3274–80 (2003).

125. H. Ardehali, Z. Chen, Y. Ko, R. Mejía-Alvarez, E. Marbán, Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 11880–5 (2004).
126. Y. Ichikawa *et al.*, Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 4152–7 (2012).
127. M. Bayeva *et al.*, Abstract 16497: Characterization of ATP Binding Cassette Protein B8 (ABCB8) as a Mitochondrial Iron and Glutathione Exporter, *Circulation* **124**, A16497– (2011).
128. O. S. Shirihai, T. Gregory, C. Yu, S. H. Orkin, M. J. Weiss, ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA-1 during erythroid differentiation., *EMBO J.* **19**, 2492–502 (2000).
129. J. C. Wolters, R. Abele, R. Tampé, Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the homodimeric ATP binding cassette transporter TAP-like (ABCB9)., *J. Biol. Chem.* **280**, 23631–6 (2005).
130. F. Zhang *et al.*, Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes., *J. Biol. Chem.* **275**, 23287–94 (2000).
131. K. G. Chen, J. C. Valencia, J.-P. Gillet, V. J. Hearing, M. M. Gottesman, Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma., *Pigment Cell Melanoma Res.* **22**, 740–9 (2009).
132. K. G. Chen *et al.*, Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5 α and ABCB 5 β) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes., *Pigment Cell Res.* **18**, 102–12 (2005).
133. Y. Huang *et al.*, Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance., *Cancer Res.* **64**, 4294–301 (2004).
134. N. Y. Frank *et al.*, ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma., *Cancer Res.* **65**, 4320–33 (2005).
135. T. Kawanobe *et al.*, Expression of human ABCB5 confers resistance to taxanes and anthracyclines., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 736–41 (2012).
136. T. Schatton *et al.*, Identification of cells initiating human melanomas., *Nature* **451**, 345–9 (2008).
137. N. Y. Frank *et al.*, Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter., *J. Biol. Chem.* **278**, 47156–65 (2003).
138. J.-P. Gillet *et al.*, Exome sequencing of ABCB5 identifies recurrent melanoma mutations that result in increased proliferative and invasive capacities, (2014).

139. I. J. Huijbers *et al.*, An inducible mouse model of melanoma expressing a defined tumor antigen., *Cancer Res.* **66**, 3278–86 (2006).
140. J. Ackermann *et al.*, Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background., *Cancer Res.* **65**, 4005–11 (2005).
141. C. De Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans, Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue., *Biochem. J.* **60**, 604–17 (1955).
142. A. Demunter, M. Stas, H. Degreef, C. De Wolf-Peeters, J. J. van den Oord, Analysis of N- and K-ras mutations in the distinctive tumor progression phases of melanoma., *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1483–9 (2001).
143. K. W. Kinzler, B. Vogelstein, Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers., *Nature* **386**, 761, 763 (1997).
144. P. L. Pearson, R. B. Van der Lijdt, The genetic analysis of cancer., *J. Intern. Med.* **243**, 413–7 (1998).
145. M. Serrano *et al.*, Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality., *Cell* **85**, 27–37 (1996).
146. M. B. Powell *et al.*, Hyperpigmentation and melanocytic hyperplasia in transgenic mice expressing the human T24 Ha-ras gene regulated by a mouse tyrosinase promoter., *Mol. Carcinog.* **12**, 82–90 (1995).
147. N. Bardeesy *et al.*, Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas., *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2144–53 (2001).
148. L. Chin *et al.*, Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo., *Genes Dev.* **11**, 2822–34 (1997).
149. M. C. Willingham *et al.*, Immunocytochemical localization of P170 at the plasma membrane of multidrug-resistant human cells., *J. Histochem. Cytochem.* **35**, 1451–6 (1987).
150. A. H. Schinkel *et al.*, Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 4028–33 (1997).
151. D. Fu, I. M. Arias, Intracellular trafficking of P-glycoprotein., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 461–4 (2012).
152. U. Mayer *et al.*, Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr 1a P-glycoprotein., *Br. J. Pharmacol.* **119**, 1038–44 (1996).
153. A. Calcabrini *et al.*, Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells., *Histochem. J.* **32**, 599–606 (2000).

154. W. Szaflarski *et al.*, Nuclear localization of P-glycoprotein is responsible for protection of the nucleus from doxorubicin in the resistant LoVo cell line., *Biomed. Pharmacother.* **67**, 497–502 (2013).
155. A. Molinari *et al.*, Detection of P-glycoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells., *Int. J. Cancer* **75**, 885–93 (1998).
156. A. Molinari, M. Cianfriglia, S. Meschini, A. Calcabrini, G. Arancia, P-glycoprotein expression in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells., *Int. J. Cancer* **59**, 789–95 (1994).
157. D. Fu, M. Bebawy, E. P. W. Kable, B. D. Roufogalis, Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: Implications in multidrug resistance in cancer., *Int. J. Cancer* **109**, 174–81 (2004).
158. D. Fu, B. D. Roufogalis, Actin disruption inhibits endosomal traffic of P-glycoprotein-EGFP and resistance to daunorubicin accumulation., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C1543–52 (2007).